

3 03086
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
(UACPyP)
Centro de Neurobiología

**LA MODULACION COLINERGICA DE LAS AFERENTES
GLUTAMATERGICAS AL ESTRIADO.**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Fisiológicas
Presenta**

ALICIA ELIZABETH HERNANDEZ ECHEAGARAY

ASESORES: Drs. Elvira Galarraga y José Bargas Diaz

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Reconocimientos	I
Agradecimientos	II
Dedicatorias	III
Abreviaturas	i
Resumen	ii
Summary	iii
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Ganglios basales	2
Aferentes	2
Eferentes	2
2.2 El Neostriado	6
Citoarquitectura del neostriado	7
<i>Neuronas espinosas medianas</i>	7
<i>Características electrofisiológicas de la neurona espinosa mediana.</i>	7
<i>Interneuronas</i>	8
<i>Interneuronas gigantes Colinérgicas.</i>	9
<i>Las interneuronas medianas:</i>	10
<i>a) Interneurona Gabaérgica inmunoreactiva a Parvalbúmina</i>	10
<i>b) Interneurona Gabaérgica inmunoreactiva a Calretimina:</i>	10
<i>c) Interneuronas que contienen somatostatina, neuropeptido Y y óxido nítrico sintetasa:</i>	10
Inervación cortical y talámica en neostriado.	11
Influencia excitatoria en el neostriado	12
2.3 La transmisión sináptica en el neostriado	15
Generalidades de la sinapsis	15
Interacciones sinápticas en el estriado.	16
Mecanismos involucrados en la liberación del neurotransmisor	18
<i>a) Liberación cuántica del neurotransmisor.</i>	18
<i>b) Participación del calcio en la liberación de neurotransmisores: Exocitosis</i>	19
<i>c) Anclaje, fusión y liberación</i>	22
2.4 Modulación de la sinapsis.	23
<i>Modulación presináptica de la liberación del neurotransmisor</i>	24

<i>Mecanismos de la modulación presináptica</i>	25
La neuromodulación en el neocórtex.	28
<i>Modulación Dopaminérgica</i>	28
<i>Modulación Colinérgica</i>	29
<i>Receptores Muscarínicos.</i>	30
2.5 Estudio de la modulación presináptica	31
Manipulaciones que afectan la transmisión sináptica	32
<i>La 4-aminopiridina (4-AP) y la transmisión sináptica.</i>	33
<i>Facilitación sináptica mediante el protocolo de pulso pareado.</i>	33
3 Planteamiento del problema	36
4 Objetivos	38
5 Metodología	39
<i>Obtención de las rebanadas cerebrales</i>	39
<i>Registro electrofisiológico</i>	39
<i>Modulación colinérgica de la liberación glutamatérgica inducida por 4-AP.</i>	39
<i>Facilitación sináptica por pulsos pareados.</i>	40
<i>Análisis Histológico</i>	41
6 Resultados:	42
<i>Identificación de la célula espinosa mediana</i>	42
<i>Modulación colinérgica de la liberación glutamatérgica inducida por 4-AP.</i>	44
<i>Facilitación sináptica por pulsos pareados.</i>	46
<i>Receptor muscarínico que controla la transmisión glutamatérgica en el córtex.</i>	49
<i>Canales de calcio involucrados en la liberación de glutamato en el neocórtex</i>	56
7 Discusión	64
<i>La acetilcolina modula la actividad glutamatérgica en el neocórtex</i>	64
<i>Los receptores muscarínicos M_2 y M_3 median la modulación colinérgica sobre las aferentes glutamatérgicas neocórtices</i>	65
<i>Posibles mecanismos de modulación.</i>	67
<i>Relación anatómica entre las interneuronas colinérgicas y las terminales glutamatérgicas</i>	70
<i>Los canales de calcio tipo N y P/Q participan en el control de la liberación de glutamato en el córtex</i>	72
<i>Importancia Clínica</i>	73
8 Conclusiones	75
9 Referencias	76

Reconocimiento

Este trabajo de tesis se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular en el departamento de Biofísica bajo la dirección de la Dra. Elvira Galarraga Palacio y del Dr. José Bargas Díaz.
Con el financiamiento de una beca de Doctorado de la DGAPA

Agradecimientos:

A los integrantes del comité de sinodales:

Dr. Roberto Prado Alcalá

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Magdalena Giordano Loyola

Dr. Jesús García Colunga

Dra. Elvira Galarraga Palacio

Dr. José Bargas Díaz

quienes con sus sugerencias ayudaron a que el documento escrito quedara mejor editado.

Al *Dr. Jorge Flores Hernández* quien no sólo me entrenó para realizar los experimentos electrofisiológicos, sino que a lo largo de mi estancia en este Instituto me brindó su amistad incondicional.

A la *Dra. Elvira Galarraga*, cuya paciencia permitió que muchas de mis dudas no se quedaran sin respuesta.

A la *Dra. Sofía Díaz Miranda* Coordinadora del Proyecto de Maestría y Doctorado del Centro de Neurobiología, por su apoyo constante durante mi estancia en el posgrado.

A mis *compañeros de laboratorio*, en especial a *Beto* quien realizó las histologías de las células registradas y a *Carmen* siempre dispuesta a colaborar, así como por brindarme su amistad desde que yo entre al IFC

Al *Dr. Fernando Barrios* y a *Rafael* quienes me ayudaron con la reconstrucción de la célula que se presenta en la tesis.

Dedicatorias

A Gabriel Gutiérrez Ospina: por su amor infinito, su continuo aliento y su compañía, porque me hace sentir la mujer más importante del mundo aunque no lo sea, porque su amor no se limita a la pareja sino al ser humano que cada uno lleva adentro. Porque su conocimiento y humildad le permiten guiar a cualquiera sin menosprecio no importando raza o condición social. Eso es lo que yo llamaría ser sabio. No cabe duda que soy una mujer afortunada.

A mis padres: Alicia Echeagaray Ramírez y Rubén Hernández Martínez, por el apoyo, la amistad y la confianza que me han brindado. Por sembrar la semilla de rebeldía que me permite avanzar día con día, aún en contra de lo establecido.

A mi mamá, cuyo cariño incondicional me ha enseñado a valorar a la gente a mi alrededor.

A mi papá quien me ha enseñado que aún en la adversidad hay que seguir adelante. Ojalá algo de lo que la ciencia hace pudiera ayudarte a recuperar nuevamente todo tu brio.

A mis hermanos: Rubén y Haydeé, porque no obstante las diferencias siempre están ahí.

A mis sobrinitos: Gustav y Moserrath cuya ternura e inocencia es como una luz encendida en la oscuridad.

A mis queridos Lanas, Pelucita y Chispita: por tantos ratos de felicidad y cariño que sólo seres como ellos pueden dar.

A Nico, Fabián y Sergio amigos en cada momento, compañeros en cada jornada, hermanos por usos y costumbres

A Irma, Lulú, Laurita, Rosa, Blanca y Paty quienes forman parte de mi ser y mi proceder en cada día

Y a todos los demás que de alguna u otra forma han estado ligados a mi a lo largo de mi vida

Gracias

Mientras yo me estaba educando, fuera de estas aulas el pueblo seguía luchando. Todos estos años el pueblo ha invertido en mi educación, así que espero actuar con rectitud y honestidad para no defraudarlo.

ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
4-DAMP	4-Diphenylacetoxy-N- (2-chloroethyl)-piperidine hydrochloride
AA	ácido araquidónico
ACh	acetilcolina
AFDX-116	11-(2-((diethylamino)metil)-1-piperidil)acetil-5,11-dihidro-6H-piridol(2,3-b)(1,4)-benzodiazepina-6-uno
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionato
Ca ²⁺	calcio
CaMKII	calcio calmodulina kinasas II
DA	dopamina
Dyn	dinorfina)
Enk	encefalina
EPSPs	potenciales sinápticos excitatorios
GABA	ácido gamma amino butírico
Glu	glutamato
GPL	globo pálido lateral
GPM	globo pálido media
IC	dosis media efectiva
IL	núcleo intralaminar
NE	neocestriado
NMDA	N-Metyl-D-Aspartato
Nt	neurotensina
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PPF	facilitación sináptica por pulsos pareados
R _v	resistencia de entrada
SNc	sustancia negra compacta
SNr	sustancia negra reticulada
SP	sustancia P
STN	núcleo subtalámico
TTX	tetrodotoxina
VTA	área ventral tegmental
ω -AgaTx-IVA	Omega-Agatoxina-IVA
ω -ConoTx-MVIIC	Omega-Conotoxina-MVIIC
ω -ConoTx-VIA	Omega-Conotoxina-VIA

Resumen

Las aferentes glutamatérgicas comandan la actividad de las células espinosas medianas del neocóstriado. Diversos moduladores regulan la liberación del glutamato en las sinapsis estriatales. En este trabajo evaluamos si la actividad colinérgica presente en el neocóstriado regula presinápticamente la liberación del neurotransmisor de las aferentes glutamatérgicas. Para tal efecto empleamos la liberación de neurotransmisor inducida por 4-aminopiridina (4-AP) en presencia de bicuculina, un antagonista GABAérgico, para aislar el componente glutamatérgico. En estas condiciones el agonista colinérgico carbacol ($1\mu\text{M}$), disminuyó, la frecuencia de aparición de los eventos sinápticos espontáneos sin cambiar la amplitud media de los potenciales sinápticos. Lo cual sugirió que el efecto del carbacol era presináptico. Para analizar que tipo de receptor colinérgico se encuentra involucrado en la modulación colinérgica empleamos el protocolo de facilitación sináptica por pulsos pareados (PPF). Los agonistas carbacol ($1\mu\text{M}$) y muscarina (50nM), incrementaron la PPF sin cambiar la resistencia de entrada de la célula postsináptica, indicando un efecto presináptico. Este efecto fué revertido por atropina ($1\mu\text{M}$), galamina ($50\text{-}100\text{nM}$), 3- α -cloroimperialina ($0.1\text{-}15\text{nM}$), 4-DAMP ($0.5\text{-}50\text{nM}$) y AFDX-116 ($0.5\text{-}50\text{nM}$). La pirenzepina ($0.5\text{-}1\text{mM}$) no tuvo efecto presináptico. El orden de potencia de los antagonistas muscarínicos fué: 3- α -Cloroimperialina > 4-DAMP > AFDX-116 > galamina. Las IC_{50} de los tres antagonistas más potentes fueron: 0.65nM , 1.0nM , y 3nM respectivamente en tanto que los coeficientes de Hill fueron 1.9, 1.4, 1.2 respectivamente. Dado que los coeficientes de Hill fueron mayores a 1 concluimos que más de un receptor está involucrado en la modulación presináptica glutamatérgica. El AFDX-116 y el 4-DAMP son antagonistas M_2 y M_3 respectivamente y ninguno de los dos tuvo un bloqueo del 100%. La cloroimperialina tuvo un bloqueo completo sin embargo, su coeficiente de Hill fué cercano a 2 por lo que es posible que este fármaco ocupe ambos tipos de receptores. Estos resultados sugieren que los receptores M_2 y M_3 participan en la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas en el estriado.

Asimismo, usando el protocolo de liberación inducida por 4-AP, analizamos el tipo de canales de calcio involucrados en la liberación de glutamato, encontrando que los canales tipo N y P/Q son los involucrados en la liberación de neurotransmisor de las aferentes excitatorias al neocóstriado.

Summary

Cortical and thalamic glutamatergic afferents command GABAergic spiny neurons activity in the neostriatum. Cholinergic interneurons also affect spiny neurons activity. We investigated whether cholinergic neurons modulate glutamatergic synaptic transmission by using 4-AP induced transmitter release and paired pulse synaptic facilitation (PPF). To isolate glutamatergic transmission, all experiments were carried out in presence of the GABA_A antagonist bicuculline (10 μM). In about 50% of 4-AP neurotransmitter induced release experiments, 1 μM carbachol decreased synaptic potentials frequency without changing post-synaptic input resistance and synaptic potentials median amplitude, suggesting that this effect is presynaptic and that not all afferents are modulated. Muscarinic agonist carbachol (1 μM) and muscarine (20 nM) increased PPF. To evaluate the receptor type involved on muscarinic presynaptic modulation, we used several muscarinic antagonists in the presence of muscarine. M_{1,4} antagonist pirenzepine did not block muscarine effects. The administration of M₂ and M₃ antagonists, however, did block muscarine effects with the following potency order: 3-α-Chloroimperialine > 4-DAMP > AFDX-384 > Gallamine. Hill's coefficients for these antagonists were, respectively, 1.9, 1.4, 1.2, suggesting the existence of more than one muscarinic receptor type in glutamatergic afferents. Our results thus suggest that M₂ and M₃ are the main muscarinic receptors involved in modulating presynaptic glutamatergic transmission.

Selective toxins for different calcium channels were used to identify the calcium channel type involved in glutamate release. 4-AP induced release showed that both N and P/Q channels are involved in glutamatergic transmission in the neostriatum.

1 Introducción

El neostriado forma parte de las estructuras que conforman los ganglios basales cuya función esta relacionada con el control motor. Dado que esta estructura recibe la mayoría de las aferentes a los ganglios basales, el estudio de los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la transmisión sináptica entre estas aferentes y las neuronas neoestriatales, así como los de la modulación sináptica, es fundamental para la adecuada comprensión de su funcionamiento. La acetilcolina es uno de los moduladores intrínsecos del neostriado, aunque la mayor parte de las acciones ejercidas por la acetilcolina en este núcleo se desconocen. Se sabe, sin embargo, que las células colinérgicas estriatales establecen conexiones con las neuronas espinosas medianas de proyección, y que sus efectos se ejercen a través de múltiples receptores localizados en la pre y la postsinapsis. No obstante, aún se carece de evidencia convincente sobre las acciones presinápticas de la acetilcolina sobre las terminales glutamatérgicas

En experimentos previos realizados en rebanadas de tejido cerebral, se ha inducido la liberación sináptica de glutamato y GABA en el estriado utilizando la 4-aminopiridina (4-AP) un bloqueador de canales de potasio. La liberación sináptica inducida por la 4-AP y registrada en las neuronas estriatales es dependiente de Ca^{2+} y provocada por potenciales de acción. La administración de un antagonista GABAérgico de los receptores $GABA_A$, como la bicuculina, bloquea los eventos sinápticos producidos por la liberación de GABA preservándose el componente glutamatérgico (Flores-Hernández et al., 1994). Esta manipulación farmacológica permite evaluar los efectos de moduladores sobre la frecuencia de los potenciales sinápticos glutamatérgicos. La facilitación sináptica por pulsos pareados, es otra manipulación electrofisiológica ampliamente usada para la evaluación de la modulación presináptica dependiente del influjo de calcio (Wu y Saggau, 1997).

Así, en el presente proyecto estudiamos la modulación colinérgica de las aferentes glutamatérgicas al neostriado. Utilizando el protocolo de liberación de neurotransmisor inducida por 4-AP, indagamos la existencia de la modulación presináptica colinérgica. Dado que el bloqueo de la entrada de calcio es uno de los mecanismos propuestos a través del cual los moduladores presinápticos inhiben la liberación del neurotransmisor, analizamos también el tipo de

canales de calcio que median la transmisión glutamatérgica mediante el empleo de toxinas selectivas para canales de calcio. Para identificar el tipo de receptor colinérgico involucrado en la modulación presináptica, empleamos el protocolo de facilitación sináptica por pulso pareado

Nuestros resultados mostraron que las aferentes glutamatérgicas al neocórtex son moduladas por agonistas muscarínicos. La modulación la ejercen a través de los receptores muscarínicos tipo M_2 y M_3 . Sin embargo, es posible que no todas las aferentes contengan estos receptores dado que usando el protocolo de liberación inducida por 4-AP, no todas las aferentes fueron moduladas

El empleo de toxinas selectivas para canales de calcio, mostraron que los canales de calcio involucrados en la liberación de neurotransmisor de las aferentes glutamatérgicas al neocórtex son del tipo N y P/Q, en tanto que los canales tipo L sólo participan si la estimulación es supraumbral.

2 Antecedentes

2.1 Ganglios basales

Los ganglios basales están constituidos por un grupo de núcleos derivados del cerebro anterior entre los que se encuentran el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido externo e interno, la sustancia negra y el subtálamo. Todas estas estructuras establecen conexiones recíprocas, además de tener conexiones con estructuras telencéficas, diencefálicas y mesencéficas. Anatómicamente, los ganglios basales son considerados como el componente principal del sistema extrapiramidal y regulan tanto la ejecución de programas motores como la integración de programas cognitivos (Young y Penney, 1993, Lovinger y Tyler, 1996).

Los núcleos caudado y putamen conforman la porción telencefálica de los ganglios basales denominada neostriado. En los primates la cápsula interna separa anatómicamente a ambas estructuras, en tanto que en los roedores el caudado y el putamen forman una sola estructura (Albin et al., 1989, Gerfen, 1992, Parent y Hazrati, 1995).

Aferentes

La mayor parte de la información proveniente de la corteza cerebral y del tálamo alcanza los ganglios basales a través del neostriado (NE) (Young y Penney, 1993). Las fibras cortico- y tálamo-estriales son de naturaleza glutamatérgica (Fonnum et al., 1981; Cherubini et al., 1988). Además de estas aferentes, el neostriado recibe fibras dopaminérgicas provenientes de la sustancia negra compacta (SNc) y del área ventral tegmental (VTA) y fibras serotoninérgicas de los núcleos del rafe dorsal.

Eferentes

La mayor parte de las células estriales son neuronas GABAérgicas que envían aferentes a la sustancia negra reticulada (SNr) y al paleostriado o globo pálido. Este último, constituido también por neuronas GABAérgicas (Young y Penney, 1993), conforma la principal fuente de

fibras eferentes de los ganglios basales. El globo pálido se subdivide en dos regiones. La primera conocida como el globo pálido lateral (GPL), envía proyecciones inhibitorias al NE, al globo pálido medial (GPM), a la SNc, al núcleo reticular del tálamo y al núcleo subtalámico. Este último desarrolla conexiones recíprocas con el GPL, y recibe proyecciones directas de la corteza cerebral. El GMP constituye la segunda región del globo pálido, y envía proyecciones inhibitorias conjuntas con la SNr hacia el tallo cerebral y a los núcleos ventrolaterales del tálamo con algunas proyecciones a los núcleos, dorsomedial e intralaminares. Los núcleos ventro-laterales del tálamo, proyectan a las cortezas motoras primaria y suplementaria. Debido a sus relaciones anatómicas los ganglios basales presentan 4 circuitos básicos: 1) El circuito sensoriomotor o extrapiramidal que participa en el refinamiento de la información motora de la corteza cerebral. 2) El circuito oculomotor, involucrado en los movimientos oculares y sacádicos, 3) El circuito asociativo, involucrado en el almacenamiento de la información y 4) El circuito límbico, involucrado en el almacenamiento de información y en funciones cognitivas (Lovinger y Tyler, 1996). La figura 1 muestra las principales relaciones anatómicas y vías neuroquímicas que constituyen los ganglios basales

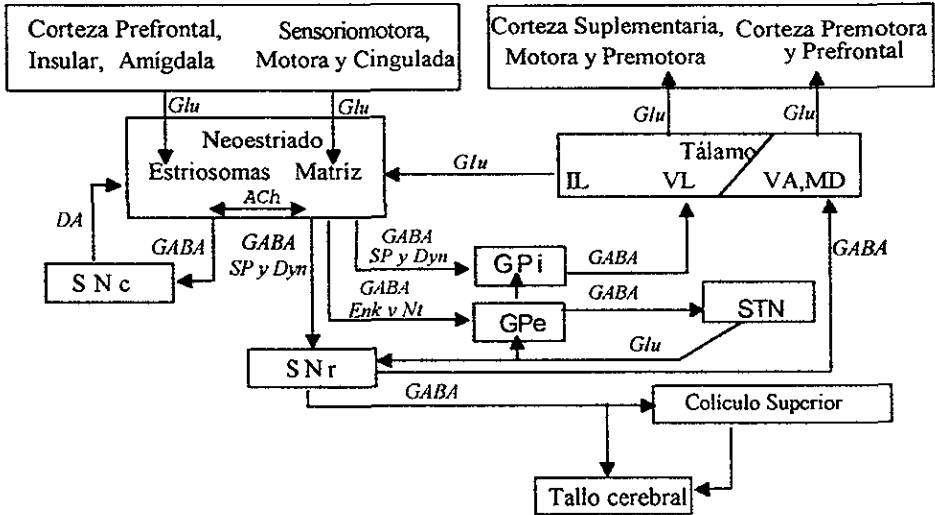


Fig. 1 Diagrama de las aferentes y eferentes principales a los ganglios basales. Note la compartimentalización de la entrada cortical hacia el núcleo estriado. Las células de proyección de los estriosomas proyectan hacia la sustancia negra compacta (SNc) y reciben aferentes de ella. Las células espinosas medianas localizadas en la matriz proyectan hacia la sustancia negra reticulada (SNr) y al globo pálido interno (GPI) y externo (GPe). El GPI proyecta hacia el tálamo ventral lateral, y este a su vez envía terminales a regiones motoras de la corteza. El GPe mantiene proyecciones recíprocas con el núcleo subtalámico (STN) quien a su vez proyecta con la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior (VA) y dorsomedial (MD). Estos núcleos proyectan hacia regiones límbicas de la corteza. También se ilustran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías. ACh (acetilcolina), DA (dopamina), Dyn (dinorfina), Enk (encefalina), Glu (glutamato), GABA (ácido γ -amino-butírico), IL (núcleo intralaminar), Ni (neurotensina), SP (sustancia P) (Modificada de Graybiel, 1990).

2.2 El Neostriado

Como se mencionó anteriormente, el neostriado constituye la entrada principal a los ganglios basales. Está dividido citoarquitectónicamente en dos compartimentos, estriosomas y matriz, que se distinguen con base en sus características citoquímicas y relaciones anatómicas. Los estriosomas, se caracterizan por contener neuronas ricas en neuropéptidos como la met-enkefalina y sustancia P, así como una concentración alta de receptores a opiodes. Los estriosomas reciben proyecciones de la corteza prefrontal, insular y la amígdala. La matriz, por otro lado, presenta niveles altos de actividad de la enzima acetilcolinesterasa. La matriz recibe aferentes provenientes principalmente de las cortezas somatosensorial, motora, y cingulada, así como de los núcleos intralaminares talámicos (Graybiel, 1990; Goldman-Rakic y Selemon, 1990). No obstante que las aferentes cortico-estriatales se encuentran segregadas en los estriosomas y en la matriz (Parent y Hazrati, 1995), las aferentes dopaminérgicas cuyo origen se encuentra en diferentes grupos neuronales mesencefálicos, proyectan sobre ambos compartimentos (Graybiel, 1990). Por otro lado, las neuronas concentradas en los estriosomas proyectan principalmente a la SNc, mientras que aquellas localizadas en la matriz proyectan hacia la SNr (Kawaguchi y Kubota, 1994), el GPM y al GPL (Gerfen, 1992). Asimismo, se sabe que las células espinosas medianas de los parches y la matriz se comunican entre ellas a través de interneuronas (Kawaguchi y Kubota, 1994). Se ha propuesto que este arreglo modular estriatal permite procesar e integrar eficientemente la información motivacional (estriosomas) y la sensoriomotora (matriz) (Graybiel, 1990).

Citoarquitectura del neocóstriado

La población neuronal que conforma el neocóstriado es heterogénea morfológica y electrofisiológicamente. A la fecha, se han identificado un tipo de neurona de proyección, la espinosa mediana (Kita et al , 1984, 1985b) y 5 tipos de interneuronas (Kawaguchi et al., 1990).

Neuronas espinosas medianas

Las neuronas espinosas medianas son células de proyección que constituyen alrededor del 90-95 % de la población neuronal total del neocóstriado. Sus cuerpos celulares miden de 12 a 20µm de diámetro. Estas células se caracterizan por tener una gran cantidad de espinas en las dendritas distales al tronco principal (Wilson, 1990). Kawaguchi y cols. (1990) clasifican a las neuronas espinosas medianas en dos subclases con base en la morfología y distribución anatómica de sus colaterales axónicas. La subclase prevalente presenta colaterales axónicas restringidas a la región de su campo dendrítico neuronal. El segundo tipo, menos común, presenta colaterales axónicas que se distribuyen ampliamente a lo largo del neocóstriado (Kita et al., 1993, Wilson, 1993). No obstante estas diferencias anatómicas, ambos subtipos celulares liberan GABA como neurotransmisor, y parecen ser capaces de co-liberar encefalinas (Gerfen, 1992) y sustancia P (Jakab y Goldman-Rakic, 1996).

Características electrofisiológicas de la neurona espinosa mediana.

In vivo, las neuronas espinosas medianas muestran una frecuencia de disparo baja. No obstante, pueden disparar trenes de potenciales de acción cuya duración puede ser de 1.0 a 2.0 segundos (Wilson, 1990, 1993). Recientemente se ha observado que el potencial de membrana de estas células oscilan entre dos estados; uno hiperpolarizado (down state) y otro depolarizado (up state) (Wilson y Kawaguchi, 1996) La presencia de esta oscilación depende de sus aferencias excitatorias (ver adelante).

In vitro, las neuronas espinosas medianas muestran un potencial de membrana de -80 mV y un umbral de disparo que se encuentra entre -40 y -50 mV (Bargas et al., 1988; Wilson, 1993). Su relación corriente voltaje no es lineal, debido a la existencia de una corriente entrante de potasio dependiente de voltaje conocida como corriente de rectificación entrante o anómala (Kita et al., 1984; Bargas et al., 1988) Esta corriente se desactiva con la despolarización (Galarraga et al., 1994) y es sensible al bario (Wilson, 1990), al cesio (Pacheco-Cano et al., 1996), y al TEA (Reyes et al., 1997) La inyección de corriente despolarizante a estas células, da lugar a una despolarización lenta en forma de rampa que puede generar un disparo repetitivo de poca adaptación cuando se prolonga la duración de la corriente inyectada. En esta despolarización lenta existen conductancias iónicas dependientes de voltaje que regulan la adaptación y el patrón de disparo de estas células (Bargas et al., 1989; Galarraga et al., 1989, Pineda et al., 1992). Aparentemente una conductancia entrante lenta de Na^+ resistente a cobalto y sensible a TTX es la responsable de la despolarización lenta (Bargas, et al 1989) Seguido a la despolarización lenta, la estimulación prolongada produce una latencia para la aparición del primer potencial de acción (Bargas et al., 1989; Nisenbaum et al., 1994), debido a la activación de una corriente transitoria de K^+ (Kita et al., 1985, Bargas et al., 1989). Nisenbaum y cols. (1994) han propuesto que esta corriente compite con las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} , lo que explica la latencia para producir el primer disparo. Asimismo, la rampa generada por la despolarización lenta es dependiente del tiempo.

Interneuronas

Las interneuronas forman una pequeña proporción del total de las células neocorticales. De acuerdo a su morfología y electrofisiología se han caracterizado 4 subtipos: interneuronas gigantes colinérgicas no espinosas, interneuronas medianas no espinosas, interneuronas medianas

lisas con varicosidades, e interneuronas inmunoreactivas a calretinina. Además de estas, recientemente se ha documentado la existencia de un subtipo de interneurona que parece tener inmunoreactividad a colecistoquinina, al péptido intestinal vasoactivo, a la dopamina, a la somatostatina, al neuropéptido Y, así como a glutamato (Kawaguchi, 1993; Mori et al., 1994).

A la fecha, sin embargo, no se han hecho estudios anatómicos, ni electrofisiológicos detallados de este tipo celular (Kawaguchi, 1993).

Interneuronas gigantes colinérgicas.

Las interneuronas gigantes colinérgicas representan menos del 3% de la población neuronal neocortical. Estas células poseen un soma que mide entre 50-60 μ m de diámetro y arboles dendríticos pobremente ramificados (Bolam et al., 1984a). Comúnmente, su axón se origina a partir de uno de los troncos dendríticos (Bolam et al., 1984a) y establece conexiones simétricas axosomáticas escasas y contactos asimétricos axodendríticos mas abundantes (Bolam et al., 1984b). Las colaterales axónicas forman plexos abundantes en la matriz y su blanco principal son las neuronas espinosas medianas (Kawaguchi, 1993, Bolam et al., 1984a).

In vivo, las interneuronas gigantes colinérgicas muestran disparo espontáneo (2-10Hz) y un potencial de reposo cercano al umbral de disparo. La proximidad del potencial de reposo al umbral de disparo sugiere que la activación de este tipo de celular requiere de la estimulación y reclutamiento de pocas fibras aferentes (Wilson, 1990). *In vitro*, se ha documentado que estas células muestran un pospotencial prolongado (Kawaguchi, 1993) y una corriente catiónica muy pronunciada. Dicha corriente es activada por la hiperpolarización (I_h) y su desarrollo es tiempo-dependiente. Esta característica le permite a la célula responder con un disparo tónico, y responder a entradas sinápticas breves (i.e. potenciales sinápticos) (Kawaguchi et al., 1995)

Las interneuronas medianas:

a) Interneurona GABAérgica inmunoreactiva a Parvalbúmina.

Las interneuronas gabaérgicas inmunopositivas a parvalbúmina constituyen el 3 al 5% del total de las células neocorticales. Estas células poseen un soma de 20-30 μm de diámetro y dendritas varicosas que se extienden de 200-300 μm del cuerpo celular. Sus axones presentan un gran número de colaterales con distribución local, lo que permite el desarrollo de una amplia red de interconexiones (Kita, 1993). Establecen contactos simétricos con somas y troncos dendríticos de neuronas locales.

In vitro, las interneuronas GABAérgicas inmunoreactivas a parvalbúmina presentan un disparo rápido de duración corta y un pospotencial corto. En respuesta a la inyección constante de corriente, responden con disparos de alta frecuencia y escasa adaptación. Este tipo de neurona se encuentra tanto en la matriz como en los estriosomes, y se ha propuesto que inhiben la actividad de las neuronas espinosas medianas (Flores-Hernández et al, 1994; Kawaguchi et al, 1995).

b) Interneurona GABAérgica inmunoreactiva a Calretina:

Las interneuronas GABAérgicas inmunopositivas a calretina son interneuronas medianas sin espinas localizadas en la región rostral medial del estriado. Hasta el momento se desconocen sus características electrofisiológicas.

c) Interneuronas que contienen somatostatina, neuropeptido Y y óxido nítrico sintetasa:

Estos tipos neuronales representan en conjunto del 1-2% del total de las células corticales. Su soma mide de 12-25 μm y presentan árboles dendríticos pobremente elaborados distribuidos espacialmente tanto en los estriosomes como en la matriz. Sus axones son largos con colaterales distribuidas sobre la región ocupada por las arborizaciones dendríticas. Estas neuronas establecen

contactos con las neuronas espinosas medianas, y reciben aferentes corticales (Kawaguchi et al., 1995). Estudios electrofisiológicos *in vitro*, han mostrado que estas células presentan una despolarización persistente, así como espigas de bajo umbral dependientes de calcio junto con espigas rápidas de sodio (Kawaguchi, 1993).

Inervación cortical y talámica en el neostriado.

En el estriado existe una convergencia masiva de aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral (Calabresi et al., 1996), así como de los núcleos intralaminares y parafascicular del tálamo (Parent y Hazrati, 1995). Esta transmisión glutamatérgica comanda la actividad de las células estriatales.

Las proyecciones corticoestriatales provienen de las capas granular e infragranular de la corteza, la mayoría de estas aferentes proyectan topográficamente al estriado. Las cortezas de asociación proyectan sobre la región rostral del putamen, así como sobre el cuerpo y cola del caudado. Las regiones sensoriomotoras de la corteza, proyectan sobre el caudado dorsolateral y a la región postcomisural del putamen. La información límbica llega al núcleo acumbens, al caudado ventral y a la parte profunda del tubérculo olfatorio.

Este arreglo anatómico sugiere que la información cortical llega a los ganglios basales a través de circuitos sensoriomotores asociativos y límbicos organizados en paralelo (Alexander et al., 1986). Así, existe una convergencia cortical dentro del estriado en donde dos áreas corticales pueden compartir la misma región sobreponiéndose (Parent y Hazrati, 1995). Las terminales corticales se arborizan en dominios restringidos (ver Fig. 2) de los campos dendríticos de las neuronas estriatales localizadas tanto en estriosomas como en la matriz (i.e. sinapsis de paso) (Parent y Hazrati, 1995). De este modo las sinapsis cortico- y tálamo -estriatales se establecen, respectivamente, con la cabeza de las espinas dendríticas y con la parte distal de la arborización

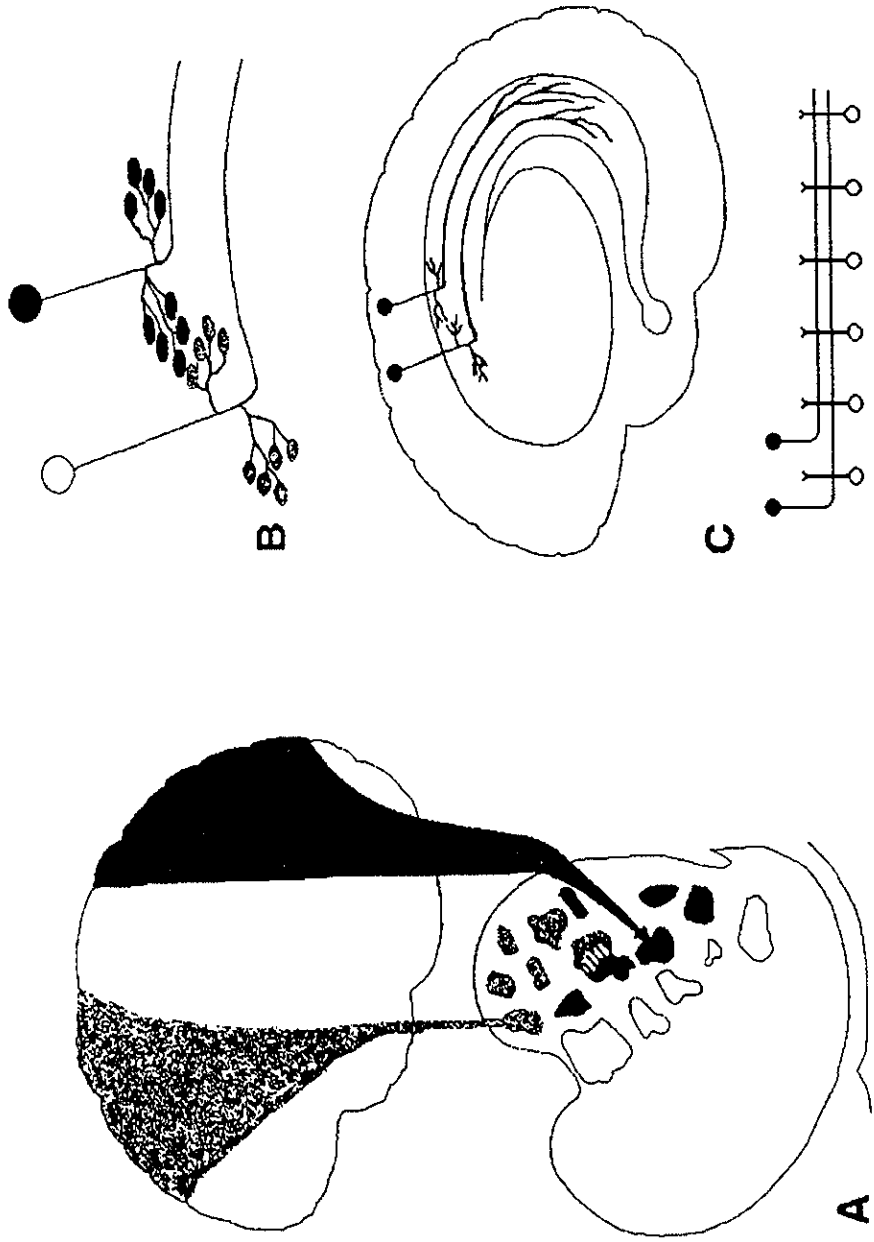


Fig 2 A: Diagrama que muestra la fragmentación e interacción de dos áreas corticales funcionalmente diferentes que proyectan sobre el estriado. Esta organización permite convergencia y divergencia de la proyección corticoestriatal. B: Representación teórica de dos células corticales pertenecientes a dos áreas corticales distintas. Sus axones se arborizan en campos terminales múltiples y pequeños que en su mayoría se encuentran segregados uno de otro. C: Representación de como un axón de una célula cortical, cruza dejando pocas ramificaciones a lo largo del plano rostrocaudal del neocórtico (Modificada de Parent y Hazrati, 1995).

dendrítica de las neuronas espinosas medianas (Smith y Bolam, 1990). Ambos tipos de aferentes forman sinapsis asimétricas (ver adelante) con las neuronas espinosas medianas (Smith y Bolam, 1990; Parent y Hazrati, 1995). A pesar de que la entrada cortical hacia el estriado es masiva, se cree que una célula estriatal recibe pocos botones corticales, máximo 4 y en promedio 1 (Somogyi et al., 1981). Las aferentes corticales también inervan a las interneuronas GABAérgicas, estableciendo con ellas contactos simétricos (Kawaguchi y Kubota, 1994). Mientras que las aferentes corticales inervan principalmente a las células espinosas medianas las aferentes talámicas lo hacen sobre las interneuronas colinérgicas (Smith y Bolam, 1990)

Influencia excitatoria e inhibitoria en el neostriado

La activación de las aferentes corticales producen cambios sobre el potencial de membrana de las células estriatales. El curso temporal de estos cambios es semejante al de las depolarizaciones e hiperpolarizaciones espontáneas de las células espinosas medianas. Cuando las depolarizaciones de las aferentes corticoestriatales alcanzan el umbral de disparo, activan a las células espinosas medianas mediante la liberación de glutamato. Se piensa que la inhibición recurrente es la responsable del bajo grado de disparo de las neuronas neostriatales (Wilson y Groves, 1981), pues se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que estas células son esencialmente silentes (Wilson, 1990, De Long 1990) presentando la mayor parte del tiempo un potencial de membrana hiperpolarizado (Wilson 1993) *In vivo* estas células presentan oscilaciones entre dos estados de actividad uno de hiperpolarización y otro de excitación (Fig.3). Esta actividad se acompaña de un incremento en el ruido sináptico que es seguida de un periodo de hiperpolarización (Wilson y Kawaguchi, 1996) Se ha planteado que las propiedades sinápticas causan esta oscilación (Calabresi et al., 1990a) El comportamiento oscilatorio sin embargo, sólo se ha observado en registros con el animal integro, y se requiere de la integridad de la entrada

excitatoria proveniente del tálamo y de la corteza (Wilson y Kawaguchi, 1996). Por otro lado, estas células poseen conductancias de potasio que mantienen el potencial de membrana negativo (Bargas et al., 1988; Calabresi et al., 1990b, Nisembaun et al., 1994), un alto umbral de disparo, y baja resistencia (Wilson, 1990). Además la activación de las interneuronas GABAérgicas por las aferentes corticales inducen la inhibición mediada a través de los receptores GABA_A de las neuronas espinosas medianas. Las células espinosas medianas tienen a su vez interacciones inhibitorias reciprocas a través de sus colaterales, las cuales se establecen entre los axones y los troncos de las espinas dendríticas, los somas o los segmentos iniciales de otros axones de las neuronas espinosas medianas localizadas en la vecindad. Este proceso de inhibición se activa solamente cuando las células de proyección se activan (Kawaguchi y Kubota, 1994). Debido a todo esto, se requiere de la sumación temporal y/o espacial de las aferentes excitatorias para lograr que las células estriatales alcancen su umbral de disparo. Así, las entradas excitatorias representan la principal fuente despolarizante de estas células (Calabresi et al., 1996)

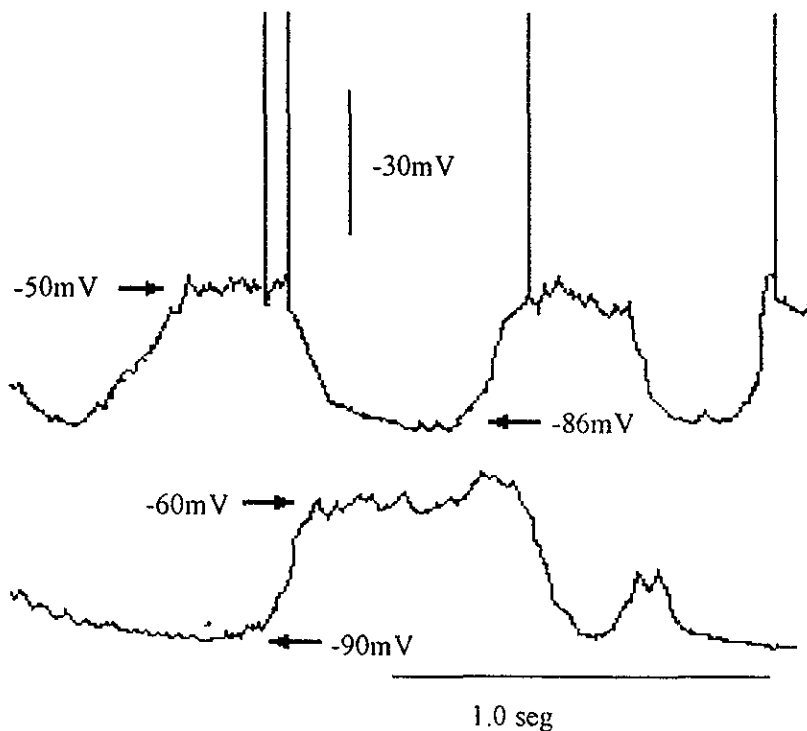


Fig. 3 Oscilaciones del potencial de membrana de las neuronas espinosas medianas.

El potencial de membrana de estas células registradas *in vivo*, presenta dos estados, uno hiperpolarizado (-86 a -90 mV) y uno depolarizado (-55 a -60 mV). Estas fluctuaciones membranales son la respuesta a las aferentes excitatorias que llegan al núcleo neocortical (Tomada de Wilson y Kawaguchi, 1996).

2.3 La transmisión sináptica en el neocórtex

Generalidades de la sinapsis

La sinapsis es el sitio especializado de comunicación entre las neuronas. Las uniones sinápticas se han clasificado de distintas maneras de acuerdo a criterios anatómicos, fisiológicos y neuroquímicos. Así, histológicamente las sinapsis pueden ser axo-somáticas, axo-dendríticas, y axo-axónicas de acuerdo a los tipos de elementos anatómicos pre-y postsinápticos asociados. También pueden ser clasificadas como asimétricas o de tipo I y simétricas o de tipo II si, a nivel ultraestructural, muestran simetría o asimetría en la disposición de las densidades sinápticas. (revisado en: Zimmerman, 1993; Hammond, 1996a)

Desde un punto de vista anatomofuncional las sinapsis pueden clasificarse como eléctricas y químicas. Las sinapsis eléctricas se caracterizan por presentar continuidad citoplásmica a través de uniones estrechas formadas por canales constituidos por conexinas. Esta unión permite el acoplamiento eléctrico uni- o bidireccional inmediato entre las células pre- y postsinápticas (ver Nicholls et al., 1992).

Las sinapsis químicas, por otro lado, poseen una hendidura sináptica y requieren de la secreción de sustancias de señalización conocidas de manera genérica como neurotransmisores. Las sinapsis químicas muestran así un retardo sináptico cuya duración depende del tiempo que tarda el neurotransmisor en ser liberado y difundir a través de la hendidura sináptica para finalmente alcanzar a su receptor situado en la membrana postsináptica y activarla (revisado en Hammond, 1996a). Con base en la velocidad de transmisión y en el tipo de receptor que media los efectos postsinápticos del neurotransmisor, las sinapsis químicas se conocen como rápidas y lentas. En las primeras, el neurotransmisor se une a un receptor acoplado a un canal iónico (i.e., receptor ionotrópico). En las segundas, el neurotransmisor se une a un receptor acoplado a

proteínas transmembranales (i.e., receptor metabotrópico) las cuales desencadenan una serie de eventos de transducción intracelular (i.e. activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos, activación de la enzima adenilato ciclasa o del metabolismo del ácido araquidónico) que, como una de sus respuestas finales, modulan la actividad de uno o varios canales iónicos. En cualquiera de los dos casos, la unión del neurotransmisor a sus receptores postsinápticos causa la apertura de canales iónicos generando así un cambio en el potencial de membrana de la célula postsináptica acercándola o alejándola de su umbral de disparo. Las conductancias iónicas activadas y la respuesta final de la célula postsináptica dependerá del tipo de receptor postsináptico (revisado en Nicholls, 1994, Zimmerman, 1993; Jonhston y Wu, 1995).

Interacciones sinápticas en el estriado.

Las interacciones sinápticas rápidas en el neostriado se establecen, entre las aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral (Cherubini et al., 1988, Wilson, 1990) y de los núcleos intralaminares del tálamo con las células espinosas medianas. Por otro lado, éstas últimas establecen conexiones recíprocas GABAérgicas entre sí (Groves, 1983; Kita et al., 1985; Jiang y North, 1991, Nisenbaum et al., 1993). En estudios *in vivo*, la activación de las aferentes corticales o talámicas produce potenciales sinápticos excitatorios seguidos de un potencial sináptico inhibitorio en las células espensas medianas (Buchwald et al., 1973). *In vitro*, la estimulación estriatal provoca potenciales sinápticos excitatorios (EPSPs) que se eliminan al reducir el Ca^{2+} , al incrementar el Mg^{2+} , o en presencia de cobalto y TTX, indicando que son mediados sinápticamente (Misguel et al., 1982; Cherubini et al., 1988; Calabresi et al., 1990b). Las sinapsis rápidas glutamatérgicas están mediadas por 3 tipos de receptores ionotrópicos: los α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionato (AMPA), los N-Metyl-D-Aspartato (NMDA) y los sensibles a ácido kainico (Dingledine y McBain, 1994), en tanto que las sinapsis

Mecanismos involucrados en la liberación del neurotransmisor

a) *Liberación cuántica del neurotransmisor.*

Los primeros estudios realizados para entender los mecanismos que subyacen a la transmisión sináptica se realizaron en las sinapsis colinérgicas de la placa neuromuscular de la rana. En esta preparación se observó que la estimulación de la terminal nerviosa induce una respuesta postsináptica. Sin embargo, en algunas ocasiones durante el registro, aparecían respuestas pequeñas (i.e., potenciales sinápticos) en ausencia de estimulación, e incluso en presencia de tetrodotoxina (TTX), un agente que bloquea a los canales de sodio. La amplitud de estos eventos era de aproximadamente 0.4mV. El análisis estadístico de las fluctuaciones observadas en la amplitud de los potenciales sinápticos de la placa neuromuscular, sugirió que el neurotransmisor se liberaba en unidades que se denominaron cuantos (revisado en: Kuno, 1995). Al mismo tiempo, se describió que el neurotransmisor se almacenaba en vesículas que se encontraban en la terminal sináptica, proponiéndose que la amplitud de la respuesta sináptica era proporcional a la cantidad de cuantos de neurotransmisor liberados. Los parámetros estadísticos considerados inicialmente para analizar los eventos sinápticos fueron: el número máximo de cuantos disponible (n) cuando el potencial de acción depolariza a la terminal sináptica, la probabilidad de liberación (p) de cada uno de ellos en presencia de la despolarización, y el promedio de cuantos liberados (m) en cada evento. Para Katz y del Castillo, el valor de p debía ser igual para cada vesícula y m debía ser igual a n veces p ($m=np$). Sin embargo, no todas las vesículas tienen la misma probabilidad de liberación por unidad de tiempo. La probabilidad de liberación en el sistema nervioso central es, por ejemplo, muy baja. Además la amplitud del potencial sináptico podría también reflejar las propiedades y la distribución de los receptores postsinápticos. No obstante estas objeciones, el primer acercamiento experimental sugirió que un

potencial sináptico era la suma de los cuantos liberados (revisado en: Zimmerman, 1993; Kuno, 1995). Hoy en día aún se debate si los factores que determinan el contenido cuántico son n y p , o bien la sensibilidad y disposición de los receptores postsinápticos.

b) *Participación del calcio en la liberación de neurotransmisores; la exocitosis*

Las vesículas que contienen neurotransmisores como el glutamato se encuentran asociadas a elementos del citoesqueleto de la célula en la terminal sináptica. Para que la molécula contenida en la vesícula se libere, se requiere de un potencial de acción que despolarice a la terminal presináptica. Una vez despolarizada, el cambio del potencial de la membrana conduce a la activación o apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La apertura de estos canales resulta en la entrada de Ca^{2+} al interior celular, lo que conduce a la liberación del neurotransmisor.

En 1973, Miledi demostró que la administración de calcio dentro de la terminal sináptica provocaba la liberación de neurotransmisor e incrementaba la depleción de las vesículas sinápticas. Se documentó que la cantidad de calcio que entra en la terminal es proporcional a la intensidad de corriente utilizada para estimular a la terminal sináptica y que la amplitud del potencial sináptico incrementa dependiendo de la concentración extracelular de calcio (revisado en Kuno, 1995). Además se mostró que el calcio entra a la terminal a través de canales dependientes de voltaje activados durante la despolarización, sugiriéndose que estos canales debían de encontrarse en la terminal sináptica (Llinás, 1992a). En el reposo las concentraciones intracelulares de calcio son bajas ($0.1 \mu M$). Sin embargo, cuando un potencial de acción despolariza la terminal presináptica, la entrada masiva de calcio incrementa la concentración intracelular de este ion (Llinás et al., 1992b). Debido al periodo tan corto existente entre la entrada de calcio y la liberación del neurotransmisor, se ha sugerido que los canales de calcio deben encontrarse muy cerca del sitio de liberación. De hecho, se ha descrito que el incremento de calcio en la terminal se localiza en sitios cercanos a los

de liberación del neurotransmisor. La entrada de calcio forma "microdominios" en los que la concentración del mismo se incrementa a 100 μ M durante la despolarización (Llinas et al., 1992c).

Hasta el momento se han descrito cinco subtipos de canales de calcio en las terminales; los tipos N, L, P (McCleskey, 1994), Q (Wheeler et al., 1994; Tareilus y Breer, 1995) y R (De Waard et al., 1996). Los dos últimos, en compañía del canal tipo P, parecen pertenecer a una subfamilia de canales cuya diferencia radica en la afinidad farmacológica que muestran por ω -toxinas (Olivera et al., 1994; Huang et al., 1996; Wheeler et al., 1996). El empleo de toxinas selectivas para cada uno de los subtipos de canales de calcio produce la inhibición en la liberación de neurotransmisor y disminuye los potenciales sinápticos dependientes del impulso nervioso (Verhage et al., 1994; Tareilus y Breer, 1995). La mayoría de las toxinas empleadas para bloquear la actividad sináptica dependiente de calcio siempre dejan actividad sináptica remanente (Bindokas et al., 1991; Wu y Saggau, 1995), sugiriendo que varias subclases de canales de calcio participan durante la liberación del neurotransmisor (Reuter, 1995; Wu y Saggau, 1995; Reid et al., 1997). En apoyo a lo anterior, algunos estudios llevados a cabo en diferentes estructuras nerviosas muestran que el bloqueo combinado de diferentes toxinas permite abolir irreversiblemente la actividad sináptica (Verhage et al., 1994).

Recientemente se ha sugerido que la liberación de distintos neurotransmisores está acoplada a diferentes canales de calcio. Así, se ha visto que en algunos casos la liberación de aminoácidos es resistente a dihidropiridinas y a ω -conotoxina GVIA que bloquean canales tipo L y N, respectivamente, pero es sensible a agatoxinas que bloquean canales de calcio tipo P y Q (Jackson y Usherwood, 1988; Turner et al., 1992). Se ha documentado que la ω -conotoxina GVIA bloquea la liberación de glutamato (Gruner y Silva, 1994), acetilcolina y de moduladores como la noradrenalina (Boehm y Huck, 1996), dopamina y serotonina (Nicolls, 1994), en tanto

que la ω -agatoxina bloquea la liberación de GABA (Santos et al , 1995). Finalmente, los canales tipo L parecen participar en la liberación de neuropéptidos (Perney et al., 1986; Trifaro y Vitale, 1993; Verhage et al., 1994)

En la tabla I se resumen los tipos de canales de calcio que se han descrito, así como el tipo de propiedades que presentan.

Tabla I
Canales de calcio dependientes de voltaje *

Propiedades y Farmacología	T Bajo umbral	L Alto umbral	N Alto umbral	P Alto umbral	R Alto umbral	Q
Umbral de activación	-70mV	-40 a -20mV	-30mV	-40mV	-40mV	?
Umbral de inactivación	-110 a -50mV	-60 a -10mV	-120 a -30mV	?	-110 a -40mV	-120a-30mV
Conductancia del canal	7-10 pS	11-25pS	10-22pS	9-19pS	14pS	?
Tiempo de apertura	0.5 a 2ms	0.5 a 10ms	0.7 a 1.5ms	<1ms	?	?
Dihidropiridina	>10 μ M	Kd<37nM	>10mM	>10 μ M	>10 μ M	?
Fenilalquilaminas	>50 μ M	<10 μ M	>10mM	?	?	
Benzodiazepinas	>10 μ M	Kd<1 μ M	>10nM	?	?	
FTX			-	si		
ω -GgTx GVIA	>5 μ M	1 μ M	Kd=0.7-30nM	>5 μ M	>5 μ M	?
ω -CgTx MVIIC	>5 μ M	>10 μ M	Kd=1-10mM	Kd<1 μ M	>5 μ M	si
ω -Aga IVA	>200nM	>200nM	>800nM	Kd=2-10nM	>100nM	si
ω -Aga IIIA	>100nM	Kd=1nM	Kd=1nM	<Kd=0.5nM	?	nM
Cd ²⁺	Kd>40 μ M	Kd=1.5 μ M	Kd=1mM	Kd?	Kd=1 μ M	si
Ni ²⁺	Kd<40 μ M	Kd=230 μ M	Kd=270mM	Kd?	Kd=65 μ M	?
Modulados por proteínas G	+	+	+	+	?	?

*Modificada de Verhage et al., 1994; Olivera et al., 1994; Miljanich y Ranachandran, 1995; Tarcilus y Brer, 1995; De Waard et al., 1996

c) Anclaje, fusión y liberación

En la terminal sináptica, las vesículas se anclan al sitio de liberación del neurotransmisor a través de interacciones establecidas entre proteínas de la membrana vesicular y de la membrana plasmática (*sinaxina*, *sinaptobrevina*, *sinaptotagmina*, y *neurexina*). Estas interacciones son sensibles al incremento de calcio de la terminal sináptica (Sollner y Rothman, 1994; Littleton y Bellen, 1995). Se cree que la fusión de la vesícula con la membrana celular se lleva a cabo por el establecimiento de un poro entre las dos membranas a través de una proteína intrínseca de la membrana, denominada *sinaptofisina* o p38. Esta proteína forma un canal parecido al observado en las uniones estrechas (De Camilli y Jahn, 1990; Gotow, 1992; Catsicas et al., 1994). Además del grupo de vesículas directamente asociado con la membrana presináptica, se ha sugerido que existe un reservorio de vesículas acoplado al citoesqueleto de la célula a través de una fosfoproteína conocida como sinapsina I (Trinfaro y Vitale, 1993). Este reservorio puede ser usado en liberaciones subsecuentes cuando se depletan las vesículas sinápticas localizadas en el sitio activo, o bien, si la estimulación es de alta frecuencia, se induce el movimiento de las vesículas sinápticas que se encuentran unidas al citoesqueleto de la célula en el sitio vesicular de reserva, hacia el sitio activo. En su conjunto, a este proceso se le conoce como exocitosis y en cada uno de sus pasos se involucran proteínas sensibles a calcio (Janh, 1994; Sollner y Rothman, 1994; Sudhof, 1995)

Así, durante la liberación del neurotransmisor, se observa un acoplamiento entre los mecanismos responsables de regular el tráfico vesicular y aquellos responsables de permitir la liberación del neurotransmisor y su remoción de la hendidura sináptica (Thomas y Almers, 1992).

Una vez liberado, el neurotransmisor difunde a través del espacio sináptico hasta alcanzar la membrana postsináptica y unirse a sus receptores

2.4 Modulación de la sinapsis.

Distintas células muestran diversas conductancias para cada uno de los iones que participan en la transmisión sináptica. Así, el patrón de disparo de las células nerviosas resulta de la combinación de ellas

Las propiedades de los canales iónicos que participan en la despolarización y repolarización de la terminal presináptica, así como aquellas de los canales localizados en la neurona postsináptica pueden ser moduladas. La modulación involucra cadenas de señalización intracelular que participan en la comunicación celular. De estas últimas, se han estudiado ampliamente las vías asociadas a proteínas transmembranales conocidas como proteínas G. Existen por lo menos 16 tipos de proteínas G acopladas a más de 100 tipos de receptores. Las principales cadenas de señalización acopladas a estas proteínas son responsables de activar e inactivar sistemas de segundos mensajeros asociados a las enzimas adenilato ciclasa, fosfolipasa C y fosfolipasa A₂. En la presinapsis, estos mecanismos modulan la duración de un potencial de acción, la cantidad de Ca²⁺ que entra a la terminal y, por consiguiente, la cantidad de neurotransmisor que es liberado en relación a cada impulso nervioso. En la postsinapsis, estos sistemas modulan la excitabilidad de la membrana cambiando las propiedades de los canales iónicos que generan el patrón temporal del disparo neuronal.

La modulación es un proceso que involucra cambios en la dependencia al voltaje, en las conductancias iónicas, en la disponibilidad de los diferentes canales, y por lo tanto en el tipo de disparo y en la forma del potencial de acción (Hille, 1992).

Debido a que la activación de receptores acoplados a proteínas G induce la activación o inhibición indirecta de canales iónicos, a los mensajeros químicos asociados a este mecanismo de

transducción se les han llamado neuromoduladores (revisado en Nicholls, 1994, Zimmerman, 1993).

Modulación presináptica de la liberación del neurotransmisor.

Una de las primeras evidencias acerca de la existencia de modulación de la liberación de los neurotransmisores en el sistema nervioso central fue obtenida en preparaciones de la médula espinal. En ellas, la estimulación de aferentes sensoriales axo-axónicas sobre las aferentes sensoriales la reducía la amplitud de los EPSPs provocados por la estimulación de estas últimas. Este cambio fue observado sin modificaciones electrofisiológicas de las motoneuronas, por lo que se concluyó que se debía a un proceso de inhibición presináptica. Así, se postuló que para que la inhibición presináptica se llevara cabo, debían cumplirse al menos dos condiciones: Primero, que hubiera una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado. Segundo, la existencia de receptores localizados en la misma terminal nerviosa, capaces de mediar los cambios en la disponibilidad del neurotransmisor (revisado en Kuno, 1995).

En la década de los 70's se reportó la presencia de receptores presinápticos que regulaban la liberación del neurotransmisor, además de aquellos receptores postsinápticos responsables de transducir la respuesta sináptica. En 1980, Langer reportó la presencia de α -adrenoreceptores en terminales noradrenérgicas, responsables de controlar la liberación calcio-dependiente del neurotransmisor. De este modo, se sugirió la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa mediante el cual la célula regulaba su liberación, pues la estimulación de autoreceptores α -adrenérgicos de la terminal inhibía la liberación de noradrenalina. También se documentó que la respuesta farmacológica a la estimulación de receptores presinápticos era diferente de aquella observada al activar los receptores postsinápticos. Posteriormente, Majewski (1983) observó que

los receptores β -adrenérgicos presinápticos incrementaban la liberación de noradrenalina. Más tarde se encontraron autoreceptores en células dopaminérgicas (Langer, 1980, 1997).

Un hallazgo importante fue la presencia de receptores presinápticos para un tipo de neurotransmisor distinto a aquel liberado por la célula, a este tipo de receptor se le denominó heteroreceptor (Langer y Arbilla, 1981; Scholz, 1993). Por ejemplo, en las sinapsis rápidas glutamatérgicas además de la modulación mediada por receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) (Schrader y Tasker, 1997), hay modulación por receptores serotoninérgicos (Shupliakov et al., 1995), receptores A_1 de adenosina (Dittman y Regehr, 1996), y receptores dopaminérgicos (Van den pol et al., 1996). Las sinapsis GABAérgicas pueden ser moduladas por receptores $GABA_A$, $GABA_B$ (Floran et al., 1988), mGluRs (Schrader y Tasker, 1997), y receptores a sustancia P (Jakab y Goldman Rakic, 1996), entre otros.

Mecanismos de la modulación presináptica

En la tabla II se resumen algunos de los mecanismos descritos para los principales neuromoduladores presinápticos

Se han descrito distintos mecanismos mediante los cuales los moduladores disminuyen la liberación del neurotransmisor, por ejemplo el GABA y el carbacol (agonista muscarínico) inhiben los canales de calcio (Zoltay y Cooper, 1990) en la terminal sináptica, mientras que otros como la cloroadenosina (Zoltay y Cooper, 1994) activan canales de K^+ (Wu y Saggau, 1997). Finalmente se han descrito moduladores que actúan directamente sobre la maquinaria intracelular encargada de la liberación (Capogna et al., 1996; Stanley y Mrotznik, 1997).

Los sistemas de señalización involucrados en estas acciones se relacionan con las cascadas de señalización del ácido araquidónico (Zoltay y Cooper, 1994), de la PKC (Zamponi et al., 1997), de la PKA (Capogna et al., 1995), y de la fosfatasa 2B (Victor et al., 1995), entre otros.

Los receptores involucrados en la modulación presináptica, están en la mayoría de las veces, asociados a diferentes proteínas G (ver tabla II) y generalmente inhiben la liberación del transmisor (Fang et al., 1994). Existen, sin embargo, receptores como los nicotínicos, no ligados a proteínas G que incrementan la liberación del neurotransmisor debido a su permeabilidad a Ca^{2+} (Alkondon et al., 1996; Lena y Changeux, 1997).

La inhibición de los canales de Ca^{2+} podría decrementar el influjo de este catión a la terminal, reduciendo así, la disponibilidad para desencadenar el mecanismo de exocitosis. La activación de canales de K^{+} reduce la duración del potencial de acción, en consecuencia se reduce la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. Sin embargo, la reducción del influjo de calcio, no puede explicar totalmente la inhibición de la liberación del neurotransmisor, que también ocurre con la liberación espontánea. Además, es posible que cada neuromodulador use diferentes mecanismos para afectar la liberación del neurotransmisor (Schulz, 1993).

En resumen, la inhibición presináptica de la liberación del neurotransmisor sirve para prevenir la liberación excesiva de neurotransmisor y así ajustar la eficacia sináptica.

TABLA II

Moduladores presinápticos y sus mecanismos

Modulador	Receptor	Estructura	Tipo de proteína G	Mensajero intracelular	Canal o proceso modulado
GABA	GABA _B	Hipocampo Cerebelo Corteza cerebral Médula espinal	G-sensible a PTX G-insensible a PTX	PKA PKC	Ca ²⁺ tipo "N" (Dutar y Nicoll, 1993; Gruner y Silva, 1994) K ⁺ Maquinaria de liberación (Thompson y Gahwiler, 1992; Lambert y Harrison, 1993; Dittman y Regehr, 1996) Ca ²⁺ (Zoltay y Cooper, 1994) Ca ²⁺ (Levtov et al., 1988)
Glutamato	mGluRs	Estriado Corteza	G-sensible a PTX	PKC	Ca ²⁺ tipo "N" (Lovinger y Lambert, 1993; Swartz et al., 1993) P/Q (Takahashi et al., 1996) K ⁺ K _{Ca} ? Maquinaria de liberación (Lovinger y Lambert, 1993) (Herrero et al., 1996)
Adenosina	A ₁	Hipocampo Estriado	G-acoplada al canal K G-sensible a PTX ?	PKC ? AMPC ?	K ⁺ Ca ²⁺ (Lupica y Dunwidie, 1993) P/Q (Ambrosio et al., 1996)
ACh	M ₁ M ₂ M ₃ M ₄	Hipocampo Corteza, Estriado y Unión neuromuscular Estriado Corteza	G-insensible a PTX ?	PKC ? GMP ? AMPC IP ₃ /DAG	? (Zamponi et al., 1997) (Vannuchi y Popcu, 1995; Ries et al., 1996; Re et al., 1993) Ca ²⁺ K ⁺
Opioides	μ κ δ		G-sensible a PTX " " " " ?	?	K ⁺ (Thompson et al., 1993b) Ca ²⁺ "N" y K ⁺ Ca ²⁺ y K ⁺ (Johnson y North, 1993)
Som	NK ₁	Hipocampo	' Gi/Go	GMPc PKA	(Scharfman, 1993) Ca ²⁺ (Boehms y Betz, 1997)

La neuromodulación en el neostriado.

Como se mencionó previamente, dadas las interacciones celulares que existen en el neostriado, las sinapsis rápidas son sujetas a la acción de neuromoduladores que se unen tanto a receptores GABAérgicos ($GABA_B$; Mitchell, 1980; Nisembaum et al, 1993), glutamatérgicos metabotrópicos (Lovinger et al, 1993, Stefani et al., 1994), purinérgicos (A_1 ; Mori et al., 1996), colinérgicos muscarínicos (Dodt y Misguel, 1986; Malenka y Kocsis, 1988), dopaminérgicos (D_2 ; Hsu et al, 1995; Flores-Hernández et al., 1997) y peptidérgicos. De especial interés han sido los sistemas muscarínico y dopaminérgico debido a que su alteración conduce a trastornos motores (DeLong, 1990)

Modulación Dopaminérgica

Las aferentes dopaminérgicas a las células neostriatales provienen de la sustancia nigra parte compacta. La aplicación de dopamina sobre el neostriado cambia el potencial de membrana y la resistencia de la célula, produciendo un decremento en el disparo neuronal (Calabresi, 1993; Akaike et al., 1987) y un aumento en la rectificación anómala (Wilson, 1990).

Estudios farmacológicos han revelado la presencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos en el estriado, los D_1 y los D_2 . Ambos tipos de receptores están presentes en las neuronas de proyección (Gerfen et al., 1992). Por otro lado, existe evidencia indirecta de que las terminales de las aferentes glutamatérgicas corticoestriatales poseen receptores D_2 (Guido et al, 1988). Por lo que se ha sugerido que los agonistas dopaminérgicos D_2 podrían controlar la liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales (Calabresi et al., 1993; Di Chiara y Morelli, 1993; Flores Hernández et al., 1994; Hsu et al., 1995).

Modulación Colinérgica

El aporte colinérgico en el neocóstriado está dado por las interneuronas gigantes que se encuentran dentro del núcleo. La administración de acetilcolina depolariza e incrementa la resistencia de entrada de las células espinosas medianas (Pineda et al., 1995). Este efecto mediado por receptores muscarínicos postsinápticos, parece deberse a un decremento en una conductancia a potasio (Wilson, 1990). La acetilcolina también reduce el pospotencial hiperpolarizante que regula el disparo neuronal de las neuronas espinosas medianas (Pineda et al., 1995). En estudios realizados con fijación de voltaje, se ha observado que en las neuronas espinosas medianas algunas corrientes de calcio son disminuidas por la acetilcolina (Howe y Surmeier, 1993). Asimismo, la administración de agonistas colinérgicos reduce la amplitud de los potenciales sinápticos glutamatergico y GABAérgico en el neocóstriado y se ha sugerido que este efecto es presináptico (Dodt y Misgeld, 1986). Sin embargo, se desconoce si la actividad colinérgica modula la actividad presináptica.

La acción de los neuromoduladores en el cóstriado es de suma importancia debido a que sus alteraciones se correlacionan con diversas patologías motoras tales como la corea de Huntington asociada a una atrofia de las neuronas GABAérgicas neocóstriales y una disminución de la actividad colinérgica (Di Figlia, 1990), o la enfermedad de Parkinson, cuya alteración principal es la degeneración de las células dopaminérgicas de proyección nigroestriatal (Wichmann y De Long, 1993). Existe evidencia experimental y clínica que muestra que el sistema colinérgico a través de sus receptores muscarínicos, modifica la presentación y el curso temporal de algunas alteraciones motoras. En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, los agonistas dopaminérgicos y los antagonistas colinérgicos muscarínicos mejoran algunos de los síntomas de la enfermedad (McGeer y McGeer, 1993). Tanto las terminales dopaminérgicas como las colinérgicas convergen

junto con las aferentes glutamatérgicas y las GABAérgicas sobre las neuronas espinosas medianas del neocórtex. Los receptores dopaminérgicos tipo D_1 y D_2 se expresan en distintas neuronas de proyección. Los receptores D_2 parecen localizarse también a nivel presináptico (Di Chiara y Morelli, 1993). A la par con la ubicación de los receptores dopaminérgicos en las neuronas neocorticales, estas células también expresan receptores muscarínicos. El papel de este tipo de receptores en la fisiología cortical es poco conocido. De esta manera, a continuación se describen los tipos de receptores muscarínicos descritos hasta el momento, cuáles se encuentran en el neocórtex, así como las cadenas de segundos mensajeros a las que están acoplados.

Receptores Muscarínicos.

La caracterización inicial de las distintas subclases de receptores colinérgicos muscarínicos se hizo con base a su selectividad a la pirenzepina. Así, se denominaron receptores M_1 los que eran bloqueados por este fármaco y M_2 si mostraban baja afinidad por él (Hammer et al., 1980; Reisine, 1992). Si bien en la actualidad se han caracterizado farmacológicamente sólo 4 subtipos de receptores muscarínicos denominados, M_1 , M_2 , M_3 , y M_4 (McKinney, 1993), se han clonado 5 subtipos m_1 , m_2 , m_3 , m_4 , y m_5 (Bonner, 1989). Los receptores m_1 , m_3 , y m_5 pertenecen a la familia de receptores M_1 , y están acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de la subunidad α de una proteína G_q y/o G_{11} insensible a la toxina Pertussis. Los receptores m_2 y m_4 , pertenecientes a la familia M_2 , inhiben a la enzima adenilato ciclasa activando la subunidad α y/o al dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G_i y/o G_o sensibles a la toxina Pertussis (Löffelholz, 1996). Los receptores muscarínicos se expresan en las células neocorticales diferencialmente. Los m_1 , presentan la mayor densidad seguidos por m_4 , m_2 , m_3 , y m_5 (McKinney, 1993). No obstante, se desconoce que tipo de receptor actúa a nivel presináptico y sobre todo si se encuentra en las aferentes glutamatérgicas. En las

terminales colinérgicas el receptor M_2 actúa como autoreceptor mientras que el M_4 participa como heteroreceptor en otras células (McKinney, 1993).

La presencia de receptores muscarínicos en las terminales glutamatérgicas sugeriría que la acetilcolina participa en el control de la liberación de glutamato como ha sido documentado en otras regiones cerebrales (Williams y Johnston, 1993). Si esto es así, el estudio de la modulación presináptica colinérgica de las aferentes glutamatérgicas al neostriado es necesario debido a la influencia que tienen estas aferentes excitatorias sobre la activación neostriatal.

A continuación se describen algunos procedimientos utilizados para estudiar el control presináptico de la liberación de neurotransmisor.

2.5 Estudio de la modulación presináptica

El tamaño de la mayoría de las terminales nerviosas en el sistema nervioso central de los mamíferos impone dificultades técnicas difíciles de soslayar para su estudio directo. No obstante, se ha diseñado una serie de técnicas anatómicas y bioquímicas que han permitido estudiar desde su organización citológica y molecular hasta los mecanismos de liberación de los neurotransmisores. A principios de los años 60's se desarrolló el sistema de perfusión con cánulas "push pull" (inyección y eyección), y posteriormente métodos de microdiálisis. Estas técnicas permiten la determinación de cambios de concentración de neurotransmisores *in vivo* asociados a su liberación. En los 70's se implementaron electrodos de carbon y la voltametría amperométrica capaces de detectar moléculas oxidables o su potencial de oxidación en el fluido extracelular (Westerinh, 1995). *In vitro* el advenimiento de las técnicas de biología molecular ha permitido la expresión de canales iónicos y receptores en células que naturalmente no los presentan (p.e. ovocitos de *Xenopus*), para estudiar, en sistemas más sencillos, sus propiedades biofísicas. Se han desarrollado técnicas de cultivos celulares y de separación diferencial que han permitido obtener

fracciones de membranas enriquecidas en los elementos necesarios para liberar neurotransmisores (sinaptosomas). (revisado en Kuno, 1996).

Una de las técnicas más usada para realizar registros electrofisiológicos ha sido la de las rebanadas de tejido cerebral. Estas pueden manipularse química y eléctricamente imitando la estimulación fisiológica que las neuronas reciben. En la mayoría de los estudios se registran cambios en las propiedades electrofisiológicas de una célula postsináptica infiriendo lo que ocurre a nivel presináptico. Esto se logra evaluando los cambios en el potencial de membrana de la célula generados por la estimulación de terminales adyacentes. La administración de un modulador, puede generar un incremento o decremento en el potencial provocado sin cambiar la resistencia de entrada de la célula o la constante de tiempo de la caída del potencial (τ_m). Dado que la célula registrada es la postsináptica, un cambio en el tamaño del potencial sináptico pero no de la resistencia de entrada sugiere que el efecto es presináptico. Asimismo la tau de caída esta dada por la capacitancia y por la resistencia de la célula en el sitio de generación del potencial sináptico registrado (Johnston y Wu, 1995), de modo que si el curso temporal de la caída no cambia, se sugiere que la modulación es presináptica (Kullmann y Siegelbaum, 1995, Malinow y Mainen, 1996). Si se analiza la liberación espontánea del neurotransmisor, el cambio en la frecuencia pero no en la amplitud promedio de los eventos sinápticos, es índice de un efecto presináptico (Fisher et al., 1997).

Manipulaciones que afectan la transmisión sináptica

Algunas manipulaciones farmacológicas como la administración de la 4-aminoquinolina (Thesleff y Lundh, 1983), la α -latrotoxina (Petrenko et al., 1993), o la 4-aminopiridina, desencadenan un incremento en la liberación de neurotransmisores (Buckle y Haas, 1982). En tanto

que la administración de toxinas inhibitoras de calcio (Tareilus y Breer, 1995) o las toxinas de tetanos o del botulismo (Mellanby y Green , 1981), inhiben la liberación del neurotransmisor.

La 4-aminopiridina (4-AP) y la transmisión sináptica.

La 4-AP es un bloqueador de canales de potasio. Cuando es administrada a concentraciones micromolares (menos de $100\mu\text{M}$) en el tejido nervioso *in vitro*, produce depolarizaciones pequeñas en la membrana celular (3-6mV) e incrementa la cantidad de neurotransmisor liberado sin afectar muchas de las propiedades eléctricas de la membrana tales como el umbral y la amplitud del potencial de acción (Buckle y Haas., 1982). Se ha reportado que al bloquear ciertos canales de K^+ aumenta el numero de terminales activadas (Obaid y Salzberg, 1996), promoviendo la entrada prolongada de calcio (Versteeg et al., 1995), incrementandose así, la cantidad de paquetes de neurotransmisor liberados. La IC_{50} de la 4-AP en las sinapsis glutamatergicas estriatales es aproximadamente $120\mu\text{M}$. Este efecto es dependiente del calcio extracelular y se elimina administrando TTX (Flores-Hernández et al , 1994). Asimismo, también se ha propuesto que los potenciales de acción generados por la 4-AP incrementan la probabilidad de apertura de los canales de calcio (Tibbs et al., 1989), ya que su efecto sólo parece incrementar la liberación de neurotransmisor provocada por los potenciales de acción y no parece tener efectos sobre la liberación cuántica de neurotransmisor (Thesleff, 1980, Agostan et al , 1983; Huang et al , 1991). Sin embargo, no se han realizado estudios suficientes para descartar completamente posibles efectos sobre la liberación cuántica.

Facilitación sináptica mediante el protocolo de pulso pareado

La interacción sináptica entre las neuronas depende, por un lado, de sus conexiones y, por otro, de la frecuencia de estimulación y la probabilidad de la liberación del neurotransmisor (Stevens y Wang, 1995). Así, existen tres formas de analizar cambios de corto plazo en las

sinapsis, facilitación sináptica por pulsos pareados, potenciación posttetánica y depresión sináptica (Kennedy, 1994)

Como se mencionó anteriormente, la liberación del neurotransmisor depende de la entrada de calcio hacia la terminal nerviosa (ver apartado 2.3). Diversos estudios muestran que la estimulación de la entrada sináptica de una neurona con un estímulo condicionante (S_1), seguido de un segundo estímulo de prueba (S_2), de igual intensidad y duración, puede generar facilitación de la respuesta al segundo estímulo si el intervalo entre ambos es breve (Creager et al., 1980; Zucker, 1989). Esta facilitación refleja un incremento en la amplitud de la segunda respuesta debido a la persistencia de Ca^{2+} en la terminal sináptica proveniente del primer estímulo (ver fig.4). Este " Ca^{2+} residual" se suma a la entrada de calcio provocada por el segundo estímulo (Kobayashi et al., 1995; Zucker, 1989; Wu y Saggau, 1994). La ocurrencia de este fenómeno está supeditada al intervalo existente entre el S_1 y S_2 (ver fig. 4). El intervalo óptimo entre ambos estímulos para obtener facilitación está entre los 20 y los 100 milisegundos (ms) (Dunwiddie y Hass, 1985; Baskys y Malenka 1991; Weisskopf et al., 1993, Fleidervish y Gutnick 1995). Sin embargo, puede obtenerse facilitación sináptica por pulsos pareados incluso a intervalos de 800 ms si se utilizan fármacos que afectan la liberación del neurotransmisor (Kahle y Cotman, 1993). Las manipulaciones que reducen la liberación de neurotransmisor como son la disminución del calcio extracelular, el incremento del potasio extracelular, o el incremento del magnesio extracelular (Igelmund y Heineman, 1995) incrementan la facilitación sináptica aunque disminuyen la amplitud de la respuesta sináptica (Dunwiddie y Lynch, 1978). Este fenómeno ocurre porque la dependencia de Ca^{2+} de la liberación es una función potencia $f(x) = (Ca^{2+})^n$ donde $n > 2$ generalmente 4. El incremento de la concentración calcio extracelular o la aplicación de estímulos supraumbrales incrementan la liberación de neurotransmisor provoca una depresión sináptica con el protocolo de pulsos pareados. En esta segunda condición se

produce la entrada masiva de calcio durante la primera estimulación, de manera que si se da un segundo estímulo en un periodo muy corto no habra suficientes vesículas sinápticas disponibles para reproducir la amplitud de la primera respuesta. Por lo tanto, usando este protocolo el efecto de una droga es presináptico si la relación entre las respuestas a S_2/S_1 cambia. Si ambas respuestas decremantan en amplitud o ambas incrementan sin cambiar la proporción existente entre ellas entonces el mecanismo de acción del fármaco es postsináptico (fig.4).

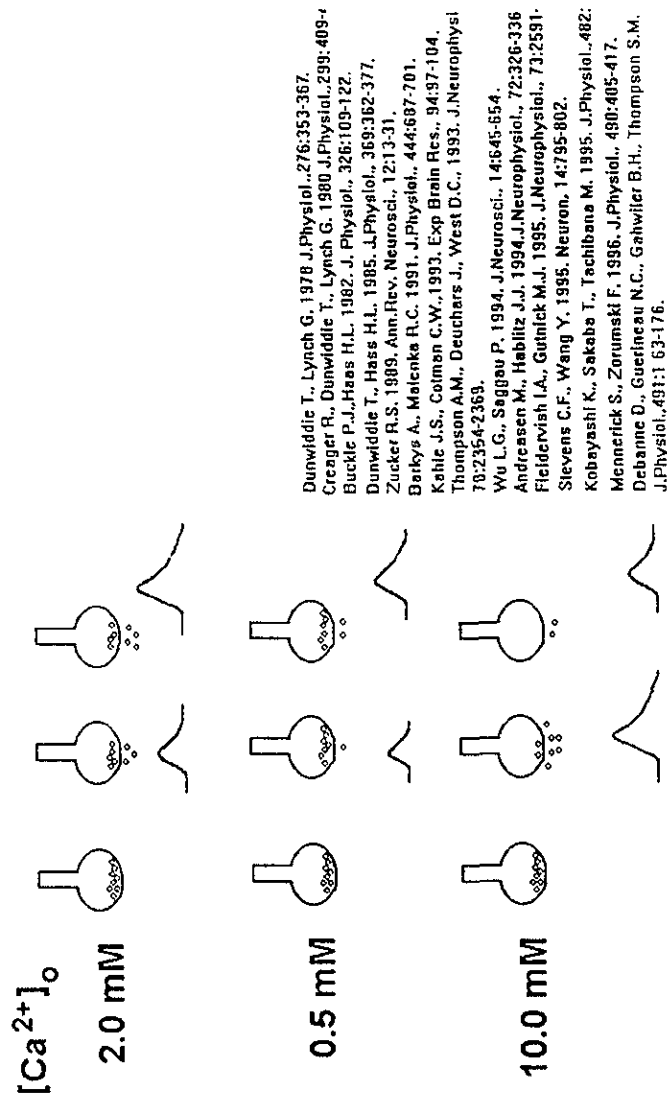


Fig. 4 La figura esquematiza el efecto de la estimulación por pulsos pareados sobre la función de una terminal nerviosa en presencia de distintas concentraciones de calcio extracelular.

Con una concentración normal de calcio (2.0mM), la amplitud de la segunda respuesta incrementa a determinada intensidad e intervalo entre los estímulos. La disminución de la concentración de calcio (0.5mM) decreta la amplitud de ambas respuestas. Sin embargo, la proporción entre las dos respuestas (S_2/S_1) incrementa. El aumento de la concentración de calcio (10mM) produce depresión sináptica de la segunda respuesta. Note que si un cambio fuese postsináptico en ambas respuestas debería cambiar su amplitud y se preservaría la proporción S_2/S_1 .

3 Planteamiento del problema.

Dado que el neostriado recibe la mayor parte de las aferentes a los ganglios basales, el estudio de los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la transmisión sináptica en estas aferentes así como los de su modulación es fundamental para la adecuada comprensión de su funcionamiento. La acetilcolina es uno de los moduladores intrínsecos en el neostriado, pero no hay evidencia contundente sobre si la acetilcolina tiene acciones presinápticas sobre las terminales glutamatérgicas. Alteraciones en la modulación colinérgica de la liberación presináptica de glutamato podrían también presentarse en trastornos motores asociados a la patología neostriatal. Por todo esto, en el presente proyecto se evaluó si la actividad de las aferentes excitatorias al neostriado es regulada presinápticamente por la acetilcolina.

Justificación

En experimentos realizados en rebanadas de tejido cerebral, se puede producir liberación sináptica de neurotransmisores mediante varios procedimientos. Por ejemplo, Flores-Hernández y cols. (1994) han mostrado que gran parte de la liberación sináptica inducida por la 4-AP y registrada en las neuronas estriatales es dependiente de Ca^{2+} e inhibida por TTX. Los potenciales que se generan en presencia de 4-AP son glutamatérgicos y GABAérgicos. Al administrar un antagonista GABAérgico de los receptores $GABA_A$, como la bicuculina, se bloquean los eventos sinápticos producidos por la liberación de GABA preservándose aquellos de contenido glutamatérgico. Esta manipulación farmacológica permite evaluar los efectos de los moduladores sobre la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos glutamatérgicos.

Con base en los antecedentes expuestos, y utilizando el protocolo de liberación inducida por 4-AP, indagamos si había modulación presináptica colinérgica. Dado que uno de los mecanismos propuestos a través del cual los moduladores presinápticos inhiben la liberación del

neurotrasmisor es bloqueando la entrada de calcio a la terminal, analizamos también el tipo de canales de calcio que median la transmisión glutamatérgica. Por último para identificar el tipo de receptor colinérgico involucrado en la modulación presináptica, empleamos el protocolo de facilitación sináptica por pulso pareado. No obstante que estos protocolos están diseñados para poder discernir entre efectos pre y postsinápticos, vigilamos parámetros tales como la resistencia de entrada postsináptica, la constante de tiempo de decaimiento de los eventos sinápticos, así como otros parámetros de excitabilidad postsináptica tales como el umbral de disparo o el potencial de membrana para asegurar que nuestros efectos fueran presinápticos

4 Objetivos:

- Mediante el uso de agonistas colinérgicos muscarínicos, determinar si la acetilcolina modula presinápticamente la liberación de glutamato en el neostriado
- Identificar el receptor muscarínico responsable de mediar los efectos de la acetilcolina en las terminales glutamatérgicas neostriatales.
- Identificar el tipo de canales de calcio involucrados en la liberación de neurotransmisor de las terminales glutamatérgicas neostriatales.

5 Metodología

Obtención de las rebanadas cerebrales: Se emplearon rebanadas de cerebro obtenidas de ratas macho Wistar (110-120 gramos de peso) Las ratas se anestesiaron con éter y se perfundieron con una solución que contenía NaCl 125mM, KCl 3.0mM, MgCl₂ 1.0mM , CaCl₂ 2.0mM , NaHCO₃ 25.0mM y Glucosa 11mM. Terminada la perfusión, los animales se decapitaron y su cerebro fue extraído y cortado sagitalmente en un vibratomo (400µm). A continuación, las rebanadas cerebrales se incubaron por más de 1h en la misma solución de perfusión saturada con 95% O₂, 5%CO₂ (300mOms/L pH 7.4, 30-34 °C). Para la realización de los experimentos únicamente de emplearon aquellas rebanadas que tuvieran el neocórtex.

Registro electrofisiológico. Se llevaron a cabo registros intracelulares en la configuración de rebanada sumergida utilizando la técnica de fijación de corriente Para la obtención del registro, se usaron microelectrodos de vidrio (borosilicato, FHC) con una resistencia de 80-120 MΩ y llenados con acetato de potasio 3M o con acetato de potasio 1.5-2M y 1% de biocitina. El potencial de membrana de la células se mantuvo entre -80 y -85mV La señal fue amplificada mediante un amplificador de alta impedancia de entrada (Neurodata IR-183), con un puente de Wheatstone con componentes activos.

Modulación colinérgica de la liberación glutamatérgica inducida por 4-AP: Los registros intracelulares se realizaron en neuronas espinosas medianas identificadas con base en sus características electrofisiológicas (Wilson, 1990) Una vez identificadas, se determinó el potencial de membrana celular en reposo (de -80 a -85mV) y la resistencia de entrada (30 a 60 MΩ). Las células fueron registradas por 10 minutos para la obtención de un trazo control. Transcurrido este tiempo, se administró la 4-AP (100µM) seguida de bicuculina (10µM) Se procedió a obtener registros de los potenciales sinápticos glutamatérgicos producidos por la 4-AP Una vez

obtenidos, se administró el agonista colinérgico muscarínico carbachol (1-2 μ M). El efecto de este fármaco se registró durante 20 minutos. Finalmente, se administró el antagonista colinérgico muscarínico atropina (1-2 μ M). Todos los fármacos fueron administrados a través de la solución de perfusión a un ritmo de 1.5 ml/min.

Canales de calcio involucrados en la liberación de neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas estriatales: Con el objeto de identificar el o los tipos de canales de calcio involucrados en la liberación de glutamato inducida o no por 4-AP, se emplearon las toxinas Omega-Agatoxina-IVA (ω -AgaTx-IVA, 200nM), Omega-Conotoxina-VIA (ω -ConoTx-VIA, 1 μ M), Omega-Conotoxina-MVIIC (ω -ConoTx-MVIIC, 500nM) y calciseptina (500nM). En estos experimentos se siguió el protocolo de la liberación inducida por 4-AP en presencia de bicuculina, y posteriormente se administraron las toxinas. Se esperó hasta 60 minutos para ver el efecto de las mismas. En aquellos experimentos en donde los potenciales sinápticos se generaron por estimulación ortodrómica, la estimulación fue subumbral y todos los experimentos fueron hechos en presencia de bicuculina.

Facilitación sináptica por pulsos pareados.

Para obtener los potenciales sinápticos excitatorios se utilizó el mismo equipo de registro empleado en el protocolo anterior. Una vez empalada la célula, las fibras aferentes se estimularon con un electrodo bipolar situado a unas 500 μ m del microelectrodo de registro. Los pulsos pareados se generaron ajustando la intensidad de la corriente para obtener pares de potenciales subumbrales. El intervalo entre S_1 y S_2 usado para obtener la facilitación sináptica fue de entre 20-100 ms.

Para bloquear la actividad GABAérgica se empleó bicuculina (10 μ M). Con el objeto de evaluar la presencia de modulación colinérgica presináptica y de identificar el o los subtipos de

receptores colinérgicos involucrados en ella se emplearon los agonistas colinérgicos carbacol (1 μ M) y muscarina (20nM), y los antagonistas pirenzepina (M_{1,4}), galamina (M₂), 11-((2-((diethylamino)metil)-1-piperidinil)acetil-5,11-dihidro-6H-piridol(2,3-b)(1,4)-benzodiazepina-6-uno (AFDX-116, M₂), 3- α -cloroimperialina (M₂) y 4-Diphenylacetoxy-N-(2-chloroethyl)-piperidine hydrochloride (4-DAMP, M₃).

Análisis Histológico

Al término de los experimentos, algunas de las células registradas fueron inyectadas con biocitina de acuerdo al protocolo descrito por Horikawa y Armstrong (1988). Brevemente, la rebanadas se fijaron en paraformaldehído al 4 % y ácido picrico al 1 % en amortiguador de fosfatos (0.1M, pH 7.4) durante 24 horas. Posteriormente, las rebanadas fueron colocadas en solución amortiguada de sacarosa al 30 % durante 24 hrs, y se cortaron en un vibratomo (60 μ m). Los cortes se incubaron con avidina-peroxidasa (Kit ABC-HRP de Vector) y tritón X-100 (0.2%) diluidos en una solución salina amortiguada por 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Después de varios lavados, la actividad de peroxidasa se reveló con 3,3-diaminobenzidina (0.05%) y peróxido de hidrógeno (0.01%) por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

6 Resultados:

Identificación de la célula espinosa mediana.

Todos los registros intracelulares empleados en este trabajo fueron típicos de las neuronas espinosas medianas. El potencial de membrana se mantuvo constante durante todo el experimento y generalmente fué de -85mV . Cuando se administraron pulsos rectangulares de corriente, se observó un desplazamiento no lineal en el voltaje, debido a la presencia de corrientes entrantes sensibles al voltaje. El umbral de disparo en estas células se observó entre -50 a -45mV . Los potenciales de acción mostraron una repolarización rápida, seguida de un pospotencial hiperpolarizante prolongado (fig.5).

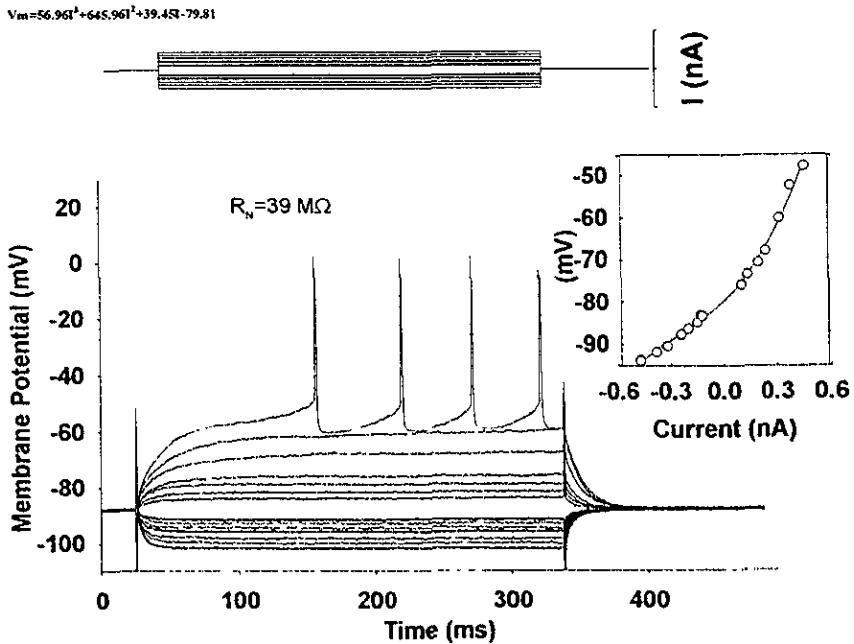


Fig. 5 Gráfica que muestra las respuestas tiempo vs voltaje (panel inferior) a las corrientes intracelulares inyectadas (panel superior). El inserto muestra la relación corriente contra voltaje.

La resistencia de entrada (R_N) promedio de las células fué de $38.9 \pm 1.8 \text{ M}\Omega$. La R_N se obtuvo derivando a potencial de reposo una función polinomial ajustada a la relación corriente contra voltaje. Estas células incrementaron su frecuencia de disparo al aumentar la intensidad de la corriente de estimulación, presentando poca adaptación de la frecuencia de disparo; la cual se aprecia en los ultimos potenciales de un tren de disparos (fig.6). Aunado a la identificación electrofisiológica, las células se marcaron con biocitina iontoforéticamente para su identificación anatómica (fig 7).

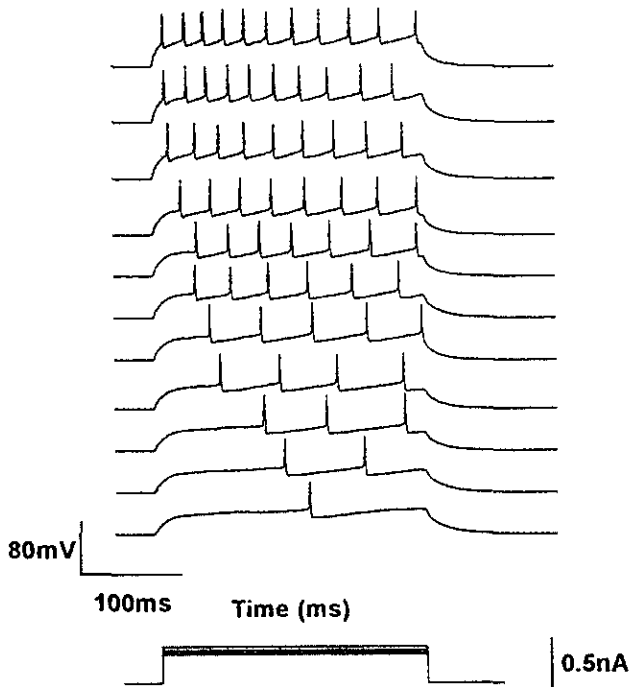


Fig. 6. Trazos que muestran la relación intensidad del estímulo contra la frecuencia del disparo en una neurona espinosa mediana del neocstriado. La aplicación de pulsos cuadrados de corriente depolarizante de intensidad creciente induce un incremento en la frecuencia de disparo con poca adaptación de la frecuencia.

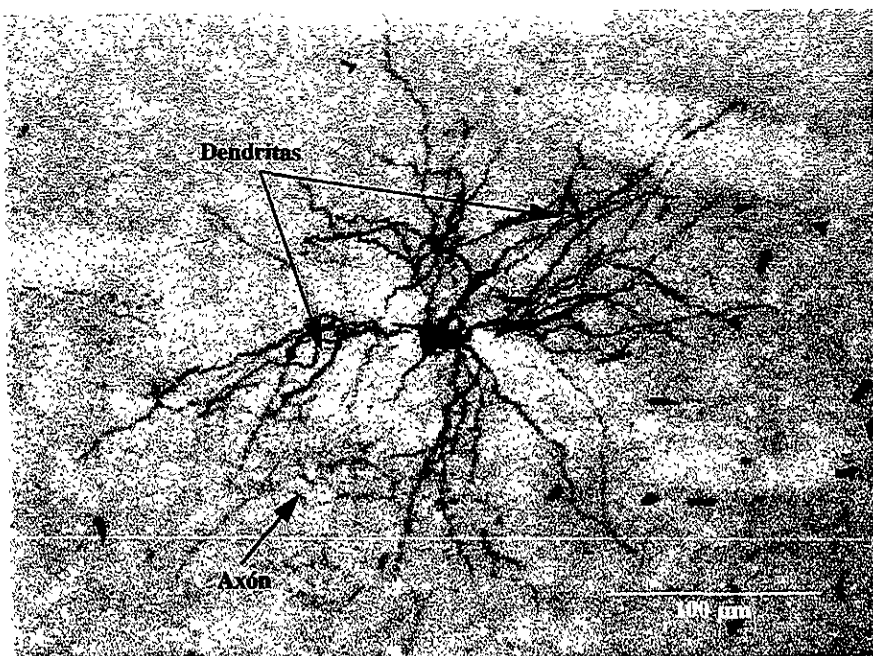


Fig. 7 Reconstrucción bidimensional que muestra la morfología de una *célula espinosa mediana inyectada con biocitina*

Modulación colinérgica de la liberación glutamatérgica inducida por 4-AP

Debido a que la 4-AP estimula tanto terminales glutamatérgicas como GABAérgicas, los experimentos siempre se realizaron en presencia del antagonista GABA_A, bicuculina (10 μ M). Esta manipulación farmacológica aisló la actividad glutamatérgica. La administración de 4-AP incrementó la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos de $0.9 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ a $4.3 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$. En presencia de bicuculina esta frecuencia se redujo a 2.6 ± 0.03 . Esta manipulación no cambió la resistencia de entrada de la célula (ver también Flores-Hernández et al., 1994; 1997). La administración de carbacol (1 μ M) disminuyó la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos en 6 de 17 células registradas (2.16 ± 0.32 control vs 1.31 ± 0.28 carbacol). Este efecto fue revertido por la administración de atropina (1 μ M) (1.31 ± 0.28 carbacol vs 2.12 ± 0.29 atropina). El análisis de varianza no paramétrico de datos correlacionados mostró una $F_{9,33}$ y una $p=0.009$ ($n=6$). La prueba de rangos de Wilcoxon mostró, que el efecto del carbacol sobre la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos fue estadísticamente significativo ($p=0.028$) al compararse con las condiciones control y con el efecto obtenido después de la administración de atropina. El análisis de los histogramas de amplitud no mostró cambios en la amplitud media de los potenciales sinápticos (1mV aproximadamente) lo que indica que el efecto del carbacol fue presináptico (fig.8). La figura 9 muestra en una gráfica de barras un resumen de un experimento típico llevado a cabo con el protocolo de 4-AP.

También se evaluó el efecto del carbacol sobre los potenciales provocados con estimulación subumbral. En estas condiciones experimentales, la reducción en la amplitud del potencial sináptico producida por carbacol fue del 64%, en tanto que la recuperación por atropina fue del 90% (fig.10)

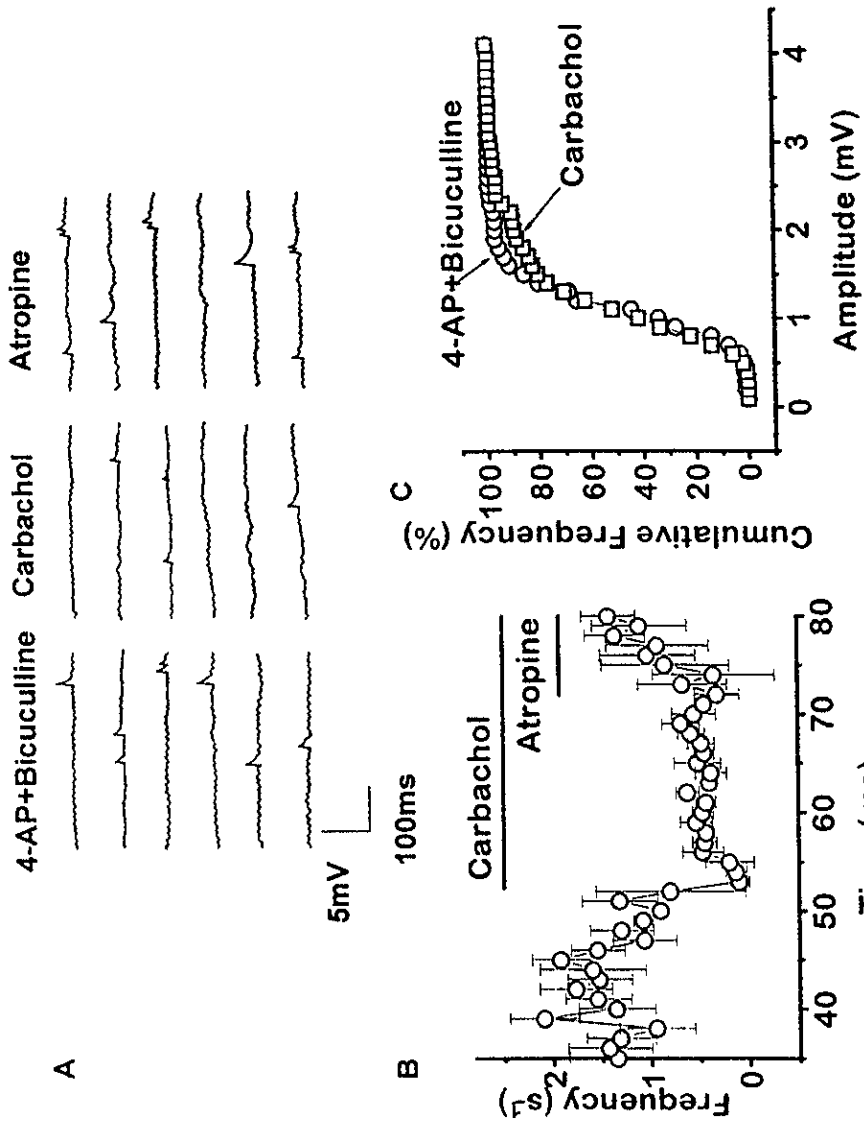


Fig. 8. Modulación colinérgica de la liberación de neurotransmisor inducida por 4-AP. A La actividad glutamatérgica aislada con $10\mu M$ de bicuculina (control). La administración de carbachol $1\mu M$ disminuyó la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos. Este efecto se revirtió con la administración de atropina $1\mu M$. B Ilustra el curso temporal del experimento. C Frecuencia acumulada de las amplitudes de los potenciales sinápticos. Note que no se observaron cambios en la distribución de las amplitudes antes y después del agonista, sugiriendo que la disminución en la frecuencia se debió a un efecto presináptico.

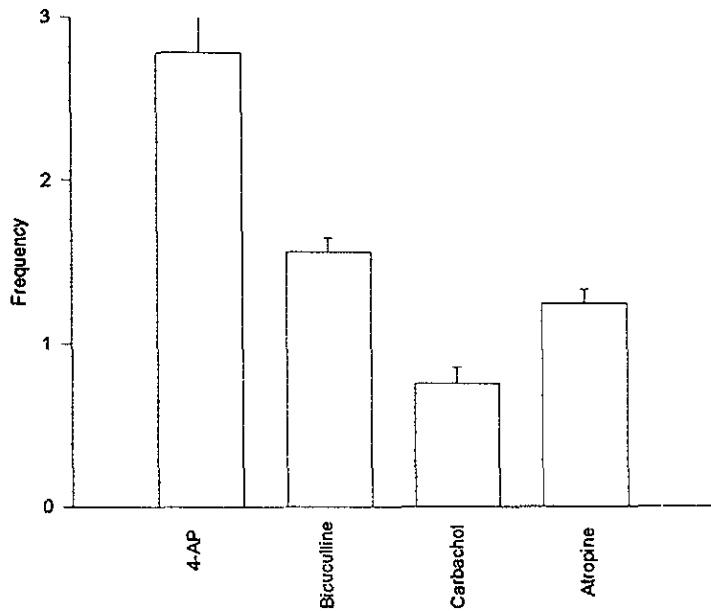


Fig. 9 Figura que ejemplifica la frecuencia promedio de los eventos sinápticos observados durante la liberación inducida por 4-AP. De izquierda a derecha las barras ilustran los efectos de 4-AP, bicuculina, carbachol, y carbachol+atropina sobre la frecuencia de aparición de los eventos sinápticos. La 4-AP induce un incremento en la frecuencia de la actividad sináptica neocortical. La administración del antagonista GABA_A bicuculina, aísla la actividad glutamatérgica. La administración de carbachol reduce la frecuencia de aparición de los eventos sinápticos glutamatérgicos. Este efecto se revierte aplicando atropina (los datos se presentan en medias con errores estándar).

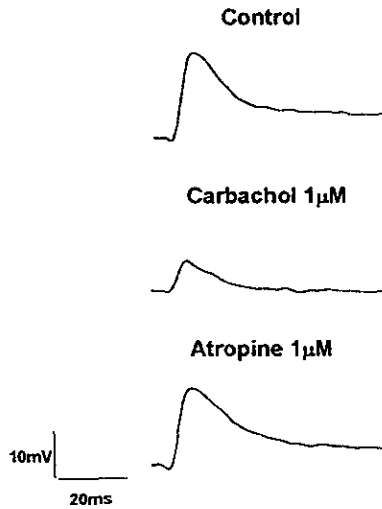


Fig. 10 Modulación colinérgica de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP).

La figura muestra EPSPs provocados con un electrodo de estimulación. En condiciones control se administró bicuculina para bloquear el componente GABAérgico. La administración de carbachol $1\mu\text{M}$ disminuyó la amplitud del EPSP, este efecto se revirtió con la aplicación de atropina $1\mu\text{M}$.

Estos potenciales pueden bloquearse completamente utilizando antagonistas glutamatergicos ionotrópicos: $10\mu\text{M}$ de CNQX y $50\mu\text{M}$ de APV (ver Flores-Hernández et al., 1994).

Facilitación sináptica por pulsos pareados.

La facilitación sináptica por pulsos pareados depende de la intensidad de estimulación y del intervalo empleado entre los estímulos (fig. 11).

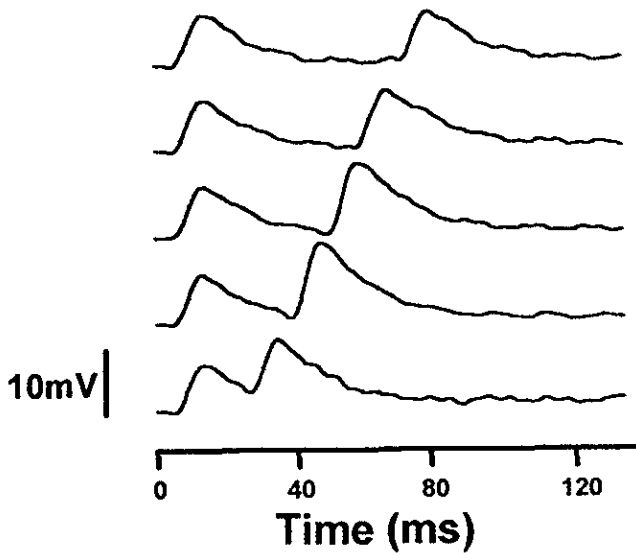


Fig. 11 La facilitación sináptica provocada por pulsos pareados depende del intervalo existente entre S_1 y S_2 . En este experimento se apreció con mayor claridad la facilitación cuando el intervalo interestímulo se encontró entre 35 y 40ms.

Con estimulación sub-umbral y a intervalos entre 20 y 100ms, las células estriatales mostraron una facilitación sináptica por pulsos pareados de $30\% \pm 5.6$ ($n=6$) Sin embargo en presencia de carbacol $1\mu\text{M}$ o de muscarina 20 nM , la relación S_2/S_1 incrementó a $53.2 \pm 2\%$ ($n=6$) y $74 \pm 5.4\%$ ($n=14$), respectivamente. Este incremento en la facilitación fue revertido casi totalmente por atropina $1\mu\text{M}$ en todos los casos (fig. 12).

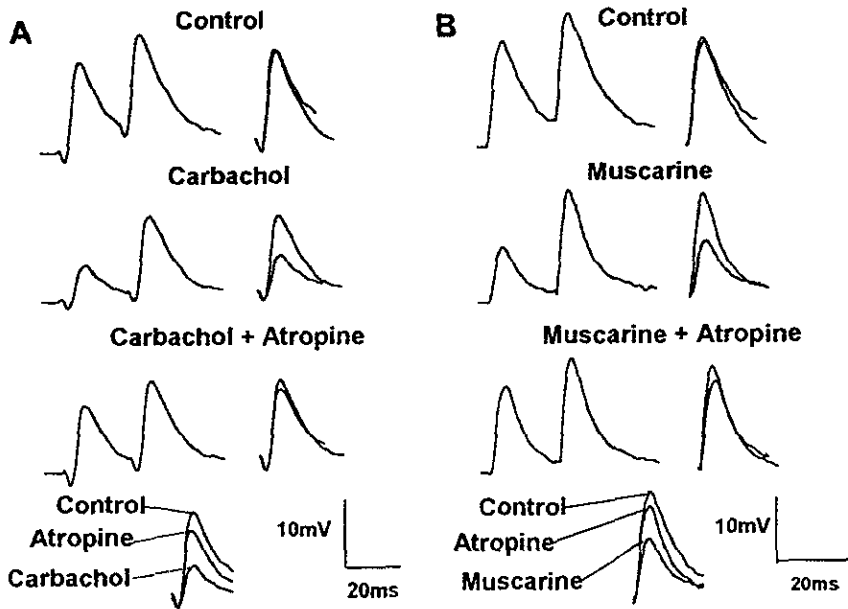


Fig.12 Los agonistas muscarínicos inhiben la facilitación sináptica producida por pulsos pareados (PPF). La administración de carbachol se ilustra en el panel A y la de muscarina en B. En condiciones control, se aplicaron un par de estímulos subumbrales de la misma intensidad, pero con un pequeño intervalo entre ellos. Ambos estímulos provocaron potenciales sinápticos. A la derecha de cada potencial se superponen el primer potencial con el segundo, para mostrar la facilitación sináptica. Como se puede observar en condiciones control no hubo PPF. La administración de $1 \mu\text{M}$ de carbachol o 20 nM de muscarina en el baño incrementaron la PPF cerca del 50 %. Nótese el decremento en la primera respuesta. La administración de $1 \mu\text{M}$ atropina revirtió la PPF casi al nivel control. En la parte inferior de la figura se superponen las primeras respuestas. Así, la PPF es un indicador más sensible de la inhibición presináptica en comparación con los potenciales provocados en los que se analiza la amplitud de una sola respuesta.

Las constantes de tiempo de la caída del potencial sináptico no cambiaron significativamente con respecto al control (A $\tau_{\text{control}}=10\pm 2$, $\tau_{\text{carbacol}}=12\pm 2$, $\tau_{\text{atropina}}=9\pm 1.8$ y B $\tau_{\text{control}}=10\pm 0.63$, $\tau_{\text{muscarina}}=10.7\pm 0.37$ y $\tau_{\text{atropina}}=10\pm 0.84$).

Dado que se puede observar facilitación sináptica por pulsos pareados en condiciones control, se analizó si parte de esta facilitación era mediada por la liberación tónica de acetilcolina endógena. La administración de atropina inhibió la facilitación sináptica observada bajo condiciones control y produjo depresión sináptica (fig. 13 A).

Receptor muscarínico que controla la transmisión glutamatérgica en el estriado.

Una vez evidenciada la modulación colinérgica presináptica de las terminales glutamatérgicas, procedimos a identificar que tipo de receptor colinérgico estaba involucrado. Así, se decidió emplear el agonista colinérgico selectivo para los receptores muscarínicos, muscarina (20nM) en presencia de diferentes antagonistas. Para evaluar la posible participación de los receptores M_1 y M_3 en la modulación presináptica de las terminales glutamatérgicas se usó el antagonista pirenzepina. Este fármaco, no bloqueó la facilitación producida por la muscarina (fig. 13 B).

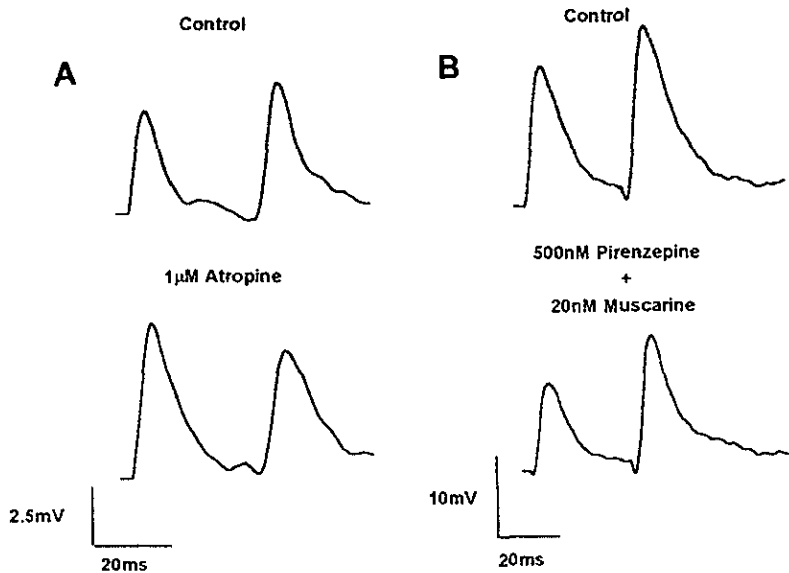


Fig.13 A Efectos de la administración de atropina sobre la liberación tónica de acetilcolina endógena. En este experimento se observó PPF en el control. La adición de 1 μ M de atropina bloqueó la PPF, sugiriendo que la atropina actúa sobre la liberación endógena de acetilcolina
 B Efectos de la administración de pirenzepina un antagonista de los receptores $M_{1,\mu}$ sobre la PPF. La administración de 500 nM de pirenzepina no bloqueó la inducción de PPF producida por 20 nM de muscarina, sugiriendo que los receptores $M_{1,\mu}$ no están involucrados en la modulación colinérgica presináptica de la transmisión glutamatérgica

Estudios de hibridización e inmunocitoquímica han sugerido la presencia de receptores M_2 en terminales presináptica (Levey et al., 1991; McKinney, 1993). Para evaluar la existencia de este tipo de receptor en las terminales glutamatérgicas del estriado, se emplearon galamina, AFDX-116 y 3- α -cloro-imperialina a diferentes dosis. Todos estos agentes son conocidos como antagonistas de los receptores M_2 (Kenakin y Boselli, 1989; Quirion et al., 1993; Baumgold et al., 1994). En contraste con los resultados obtenidos con pirenzepina, todos los antagonistas muscarínicos del tipo M_2 bloquearon la facilitación sináptica por pulsos pareados inducida por 20nM de muscarina (fig.14) sin cambiar las constantes de tiempo de caída del evento sináptico (galamina: $\tau_{control}=6\pm 1.2$; $\tau_{galamina+muscarina}=7\pm 0.9$; $\tau_{muscarina}=5\pm 1.4$; AFDX-116: $\tau_{control}=28\pm 1.30$, $\tau_{AFDX-116+muscarina}=29\pm 2.48$, $\tau_{AFDX-116}=28\pm 2.15$; 3- α -cloro-imperialina: $\tau_{control}=15\pm 0.9$, $\tau_{3-\alpha\text{-cloro-imperialina+muscarina}}=13\pm 2$, $\tau_{muscarina}=14\pm 0.7$). Note que cuando la muscarina se administró con el antagonista no hubo aumento en la facilitación, no obstante, el lavado de los antagonistas permitió la aparición de la facilitación sináptica por pulsos pareados inducida por muscarina

Con el objeto de evaluar la posible participación de los receptores tipo M_3 en la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas al neostriado, se empleó el antagonista específico para este tipo de receptor conocido como 4-DAMP, una mostaza nitrogenada. Debido a que la unión de este compuesto a los receptores M_3 es irreversible, en estos experimentos se invirtió el orden de las drogas. La administración del antagonista irreversible M_3 , 4-DAMP, también bloqueó la facilitación sináptica inducida por muscarina (fig.15) sin cambiar las constantes de tiempo de caída del potencial sináptico ($\tau_{control}=10.4\pm 0.6$, $\tau_{muscarina}=10.4\pm 1$ y $\tau_{4-DAMP}=10.2\pm 1$).

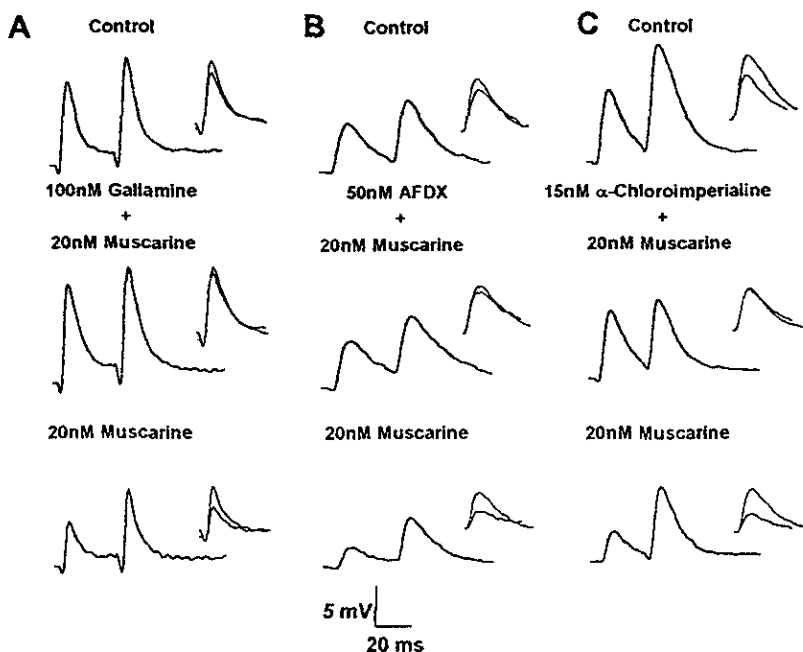


Fig.14 Los agonistas del receptor M_2 , Galamina, AFDX-116 y la 3- α -chloroimperialina bloquearon la PPF inducida por muscarina. **A** Administración de Galamina. Bajo estas condiciones experimentales no se presentó PPF en la condición control. La administración de 100 nM de galamina, en presencia de 20nM de muscarina bloqueó completamente los efectos de la muscarina sobre la PPF. El lavado de la galamina revirtió completamente el efecto. **B** Administración de AFDX-116. En este experimento se observó cierta PPF en el control. La PPF control y la inducida por 20 nM muscarina se bloquearon con la administración de 50nM AFDX-116. El lavado del AFDX-116 permitió la PPF inducida por muscarina. **C** Administración de 3- α -chloroimperialine. La PPF observada en el control se bloqueó en presencia de 15 nM 3- α -chloroimperialine, este antagonista además previno el incremento en la PPF producido por 20 nM muscarina. El lavado de la 3- α -chloroimperialine permitió el incremento en la PPF inducido por muscarina. Notese el decremento en la amplitud del potencial sináptico durante la administración de muscarina.

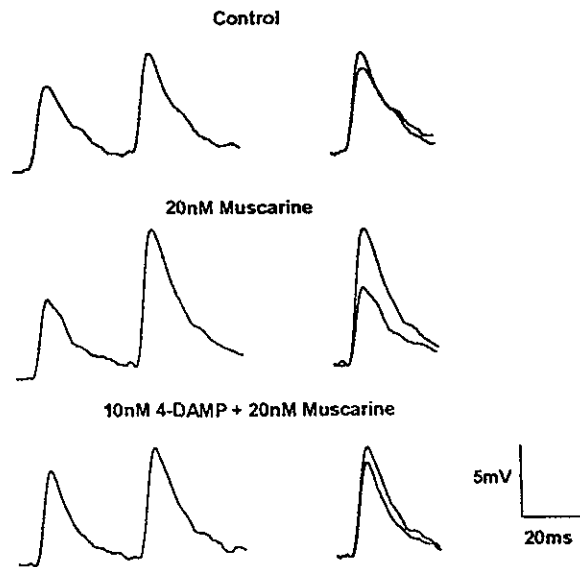


Fig.15 El antagonista muscarínico M_3 irreversible 4-DAMP, bloquea la PPF inducida con muscarina. La PPF control incrementó en presencia de 20 nM de muscarina. La adición de 10nM de 4-DAMP bloqueó la PPF inducida por muscarina. En este experimento se invirtió el orden de las drogas debido a que se empleó la mostaza nitrogenada irreversible 4-DAMP.

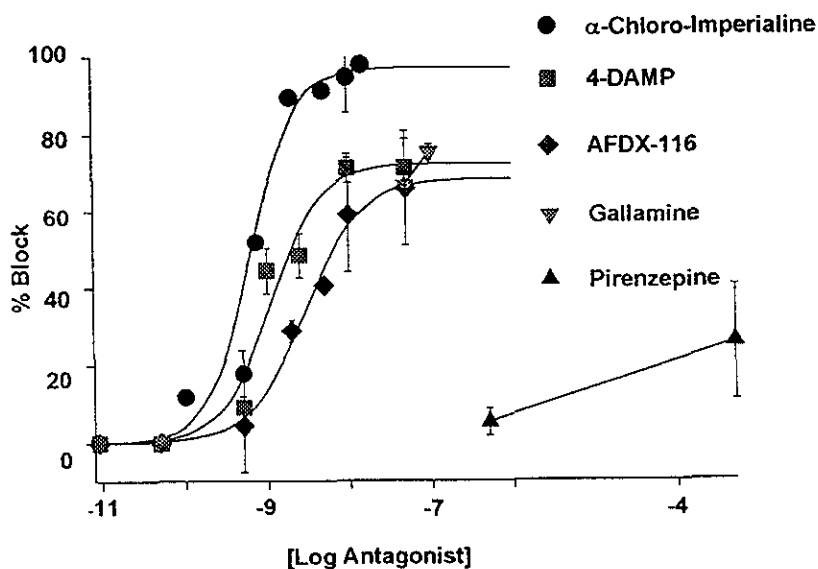


Fig. 16. Curva dosis-respuesta para diferentes antagonistas muscarínicos. De izquierda a derecha el orden de potencia de las drogas fue: 3- α -chloroimperialina > 4-DAMP > AFDX-116 > galamina > pirenzepine. La dosis media efectiva para las tres drogas más potentes fue: 3- α -chloroimperialina EC_{50} = 65 pM, 4-DAMP IC_{50} = 1.0nM, AFDX-116 EC_{50} = 3.0 nM. Los demás antagonistas necesitaron concentraciones mas altas para bloquear la PPF inducida por muscarina. Note que la concentración efectiva del antagonista M_3 el 4-DAMP, se encuentra entre dos antagonistas M_2 la 3- α -chloroimperialina y AFDX-116. En contraste, el antagonista $M_{1,4}$ pirenzepina no fue efectivo aún en concentraciones micromolares. Estos resultados muestran que los receptores muscarínicos M_2 y M_1 median la inhibición presináptica de las aferentes glutamatergicas neocorticales.

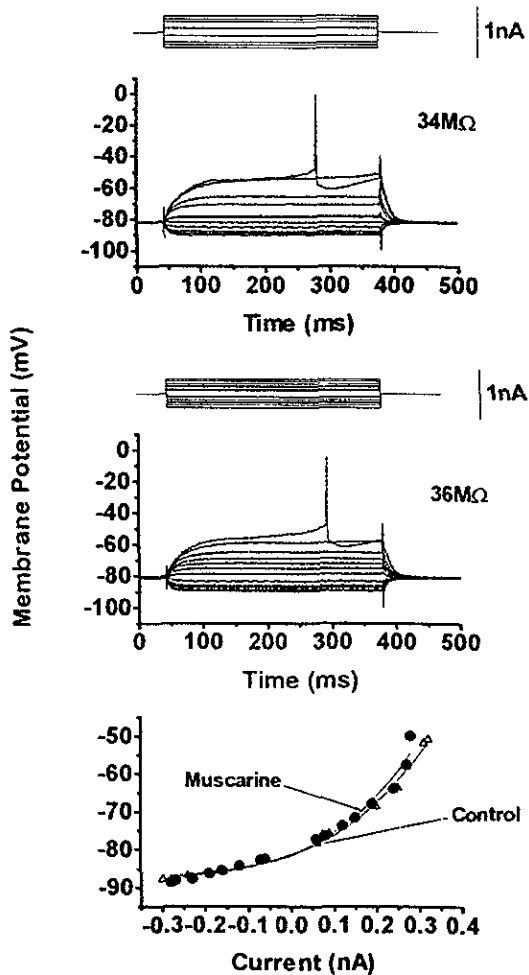


Fig 17 La administración de los agonistas muscarínicos, a concentraciones nanomolares, inhiben presinápticamente la liberación del neurotransmisor sin afectar las propiedades de la membrana postsináptica. A Se muestra la respuesta en el voltaje transmembranal a pulsos rectangulares de corriente en condiciones control. B Se muestra la respuesta de la misma neurona en presencia de 20 nM de muscarina. C Se superponen la relación corriente-voltaje originados de los datos en A y B. Note que la resistencia de entrada (R_{in}) no cambia (triángulos control, círculos muscarina).

El análisis de las curvas dosis-respuesta de los antagonistas empleados en este estudio definieron el siguiente orden de potencia. 3- α -cloroimperialina > 4-DAMP > AFDX-116 > gallamina > pirenzepina (fig.16)

La dosis media efectiva (IC_{50}) para las tres drogas más potentes fue de 0.65 nM, 1.0 nM y 3.0 nM, y sus coeficientes de Hill fueron 1.9, 1.4 y 1.2, respectivamente. Dado que los coeficientes de Hill fueron mayores que 1, nuestros datos sugieren que en las terminales glutamatérgicas estriales hay más de un receptor muscarínico controlando la liberación del neurotransmisor. El AFDX-116 y el 4-DAMP bloquearon cerca del 70% de la facilitación inducida por muscarina, en tanto que la 3- α -cloroimperialina bloqueó el 100% de la facilitación. Estos resultados sugieren que el AFDX-116 y el 4-DAMP bloquearon sólo un tipo de receptor M_2 y M_3 , respectivamente, en tanto que la 3- α -cloroimperialina bloqueó ambos tipos de receptores. Es importante mencionar que, en las concentraciones usadas, la muscarina no produjo cambios en la R_N (ver fig.17).

Canales de calcio involucrados en la liberación de glutamato en el neoestriado

Algunos estudios han mostrado que la acetilcolina actúa sobre algunas corrientes de calcio (e.g., Howe et al.,1995) Así, la modulación colinérgica de la liberación de glutamato en el neoestriado pudiera resultar de la modificación de las conductancias de los canales de calcio en las terminales. Con el objeto de identificar el o los tipos de canales de calcio que posiblemente participan en el control de la liberación de glutamato en el neoestriado, se emplearon toxinas específicas dirigidas contra aquellos canales que se sabe están involucrados en la transmisión sináptica. Las toxinas ω -AgaTx-IVA (200nM), ω -ConoTx-VIA (1 μ M), ω -ConoTx-MVIIC (500nM) disminuyeron parcialmente la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos inducidos por 4-AP. No se observaron cambios en los histogramas de amplitud de los potenciales

lo que apoya que el efecto obtenido es presináptico (fig.18). La administración conjunta de ω -ConoTx-VIA ($1\mu\text{M}$) y ω -AgaTx-IVA (200nM), produjo efectos aditivos (fig 19).

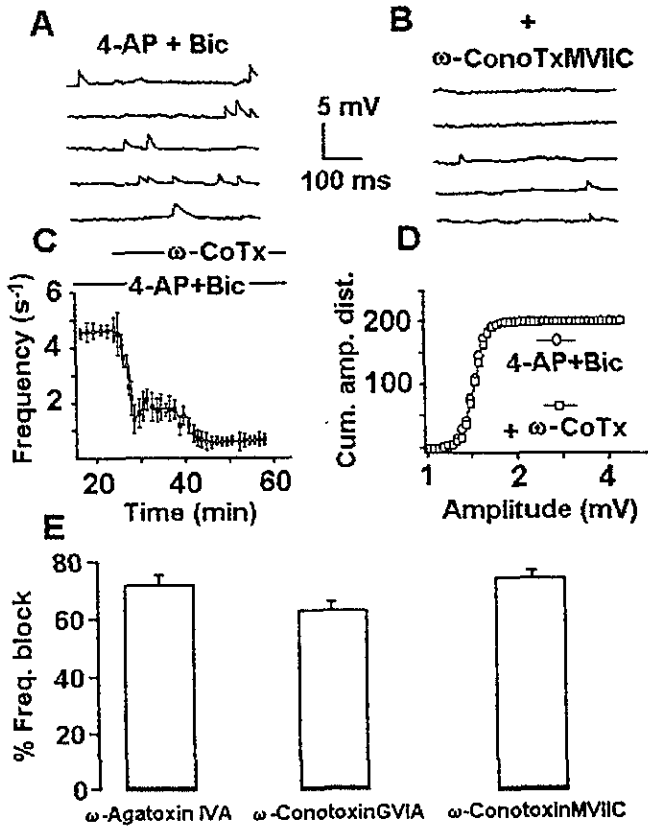


Fig.18. Figura que muestra la acción de diferentes toxinas de calcio (ω -AgaTx-IVA 200nM, ω -ConoTx-VIA 1 μ M, ω -ConoTx-MV1IC 500nM) sobre la frecuencia de aparición de potenciales sinápticos inducidos por 4-AP. **A**, muestra trazos del registro en condiciones control y **B** el efecto la ω -ConoTx-VIIC sobre los eventos sinápticos. **C** muestra el curso temporal del experimento y **D** la distribución acumulada de las amplitudes. En **E** se presenta el porcentaje de disminución de las diferentes toxinas sobre la frecuencia de los potenciales inducidos por 4-A.

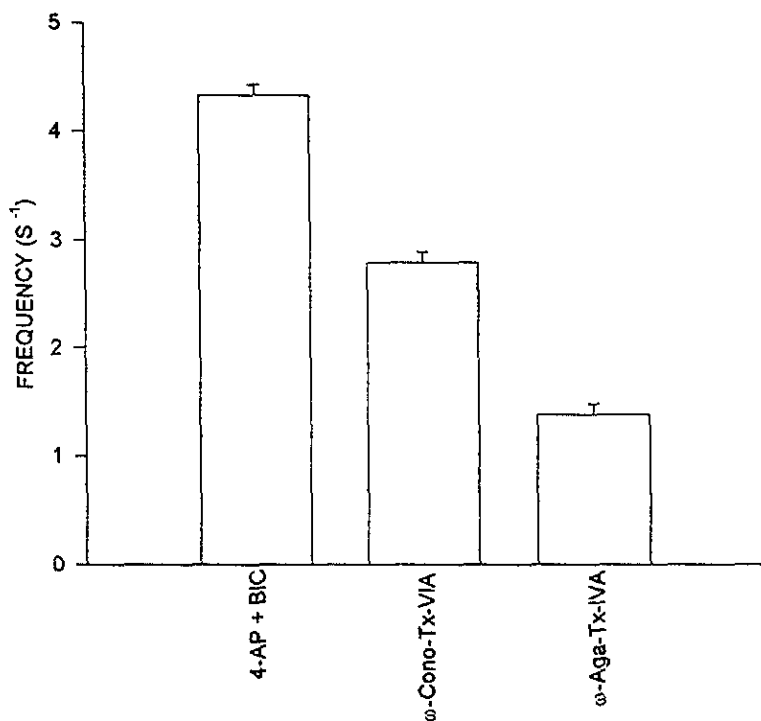


Fig. 19. La administración conjunta de toxinas de calcio produjo efectos aditivos sobre la liberación de glutamato inducida por 4-AP. En la figura se muestra que el incremento en la frecuencia de los eventos sinápticos producido por 4-AP en presencia de bicuculina disminuye al administrar ω -ConoTx-VIA 1 μ M. Esta frecuencia decae aún más al adicionar ω -AgaTx-IVA 200nM en presencia de ω -ConoTx-VIA 1 μ M. Note que después de la administración de ambas toxinas la frecuencia de aparición de los eventos sinápticos es similar a la encontrada de manera espontánea antes de la adición de la 4-AP (i.e. 1/seg).

Finalmente se evaluó el efecto de las toxinas ω -AgaTx-IVA (200nM), ω -ConoTx-VIA (1 μ M), ω -ConoTx-MVIIC (500nM) y calciseptina (500nM) sobre la frecuencia de aparición de los potenciales sinápticos provocados (Fig.20). Las tres primeras toxinas redujeron la amplitud de los potenciales sinápticos, mientras que la calciseptina sólo mostró efecto con intensidades de corriente supraumbral (fig. 21). Al igual que en los potenciales sinápticos inducidos por 4-AP, al administrar conjuntamente ω -ConoTx-VIA (1 μ M) y ω -AgaTx-IVA (200nM) con el protocolo de potenciales provocados, se observó un efecto aditivo (fig. 22). La tabla II resume nuestros hallazgos.

**TABLA III
TOXINAS DE CANALES DE CALCIO EMPLEADAS**

TOXINA	REDUCCION		CANAL INVOLUCRADO
	EPSPs	sinápticos espontaneos	
ω -AgaTx IVA (n=4)	35 \pm 2.2 %	73 \pm 2%	P/Q (>200nM)
ω -ConoTx VIA (n=3)	37 \pm 1.3%	64 \pm 2%	N (1 μ M)
ω -ConoTx MVIIC (n=3)	39 \pm 2.3 %	75 \pm 1%	P (μ M) Q (μ M)
Calciceptina	sin efecto significativo		L (μ M)

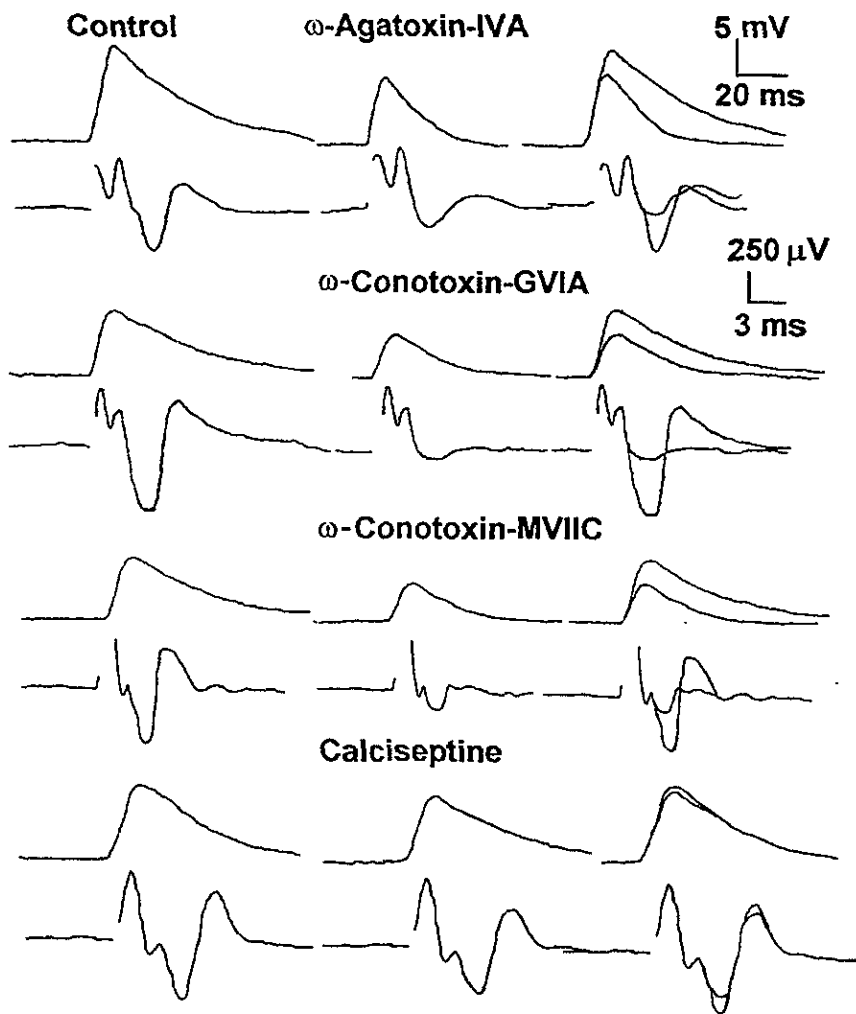


Fig. 20 La figura muestra el efecto de ω -AgaTx-IVA, ω -ConoTx-VIA, ω -conoTx-MVIIC y calciseptina sobre la amplitud de EPSPs (arriba) y potenciales de campo glutamatérgicos (en presencia de bicuculina). Los primeros trazos de cada renglón muestran las condiciones control, los trazos de en medio muestra el efecto de las toxinas y en el último trazo del renglón se sobreponen el EPSPs control y el EPSPs en presencia de la toxina. Note que las tres primeras toxinas producen decremento en la amplitud de los potenciales, en tanto que la calciseptina no los modifica significativamente.

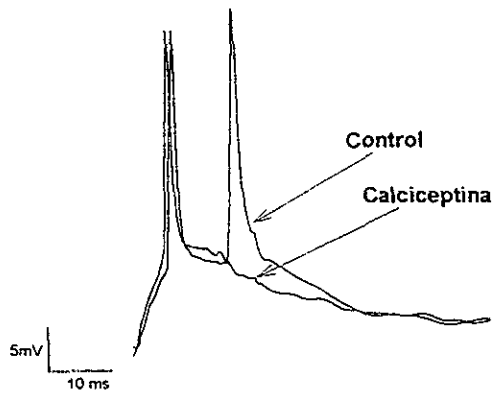


Fig.21 El bloqueo de los canales tipo L presentó efecto únicamente sobre la estimulación supraumbra. La figura muestra la sobreposición de un par de potenciales de acción producidos ortodrómicamente. La administración del inhibidor de canales L, la calciceptina 500nM. Como puede observarse la calciceptina redujo la duración del potencial producido ortodrómicamente, eliminando la segunda espiga.

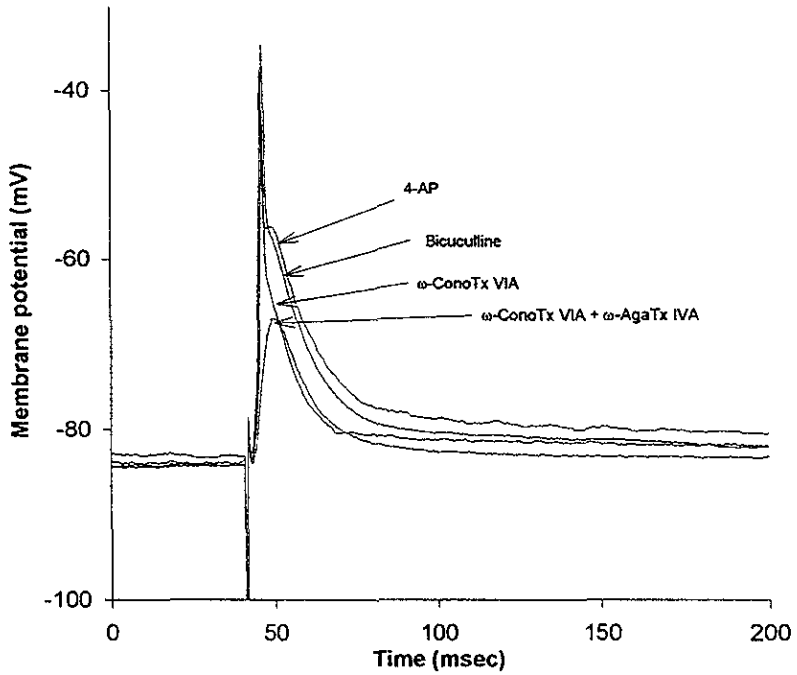


Fig. 22. La administración conjunta de toxinas de calcio produjo efectos aditivos en los EPSPs. Un EPSPs supraumbrales redujo su duración al eliminar el componente GABAérgico. El EPSP supraumbrales glutamatérgico se redujo al administrar ω -ConoTx-VIA $1\mu\text{M}$. La adición posterior de ω -AgaTx-IVA 200nM eliminó el potencial ortodrómico. El efecto de estas toxinas fue irreversible.

7 Discusión

La acetilcolina modula la actividad glutamatérgica en el neostriado.

Los experimentos descritos en el presente trabajo muestran que la actividad de las aferentes glutamatérgicas al neostriado es modulada por acetilcolina. Esta conclusión se apoya en observaciones que muestran que el agonista colinérgico muscarínico carbacol, en ausencia de actividad GABAérgica, reduce la frecuencia de liberación del neurotransmisor inducida por 4-AP, sin cambiar la amplitud media de los eventos sinápticos sugiriendo así que actúa sobre receptores presinápticos. Esta respuesta es específica ya que fue revertida por atropina, un antagonista colinérgico muscarínico, indicando así que las aferentes que incrementaron su liberación a causa de la 4-AP son moduladas por receptores muscarínicos. Aproximadamente alrededor del 50% de las aferentes presentaron modulación por carbacol, lo que sugiere que no todas las terminales glutamatérgicas al neostriado poseen receptores muscarínicos. En apoyo a esta suposición, resultados previos obtenidos en el laboratorio han mostrado que la administración del agonista dopaminérgico tipo D₂ quinpirole decrementa la frecuencia de los potenciales sinápticos glutamatérgicos inducidos por 4-AP en un porcentaje muy pequeño de los casos (Flores-Hernández et al., 1997).

Una explicación alternativa al efecto heterogéneo de los agonistas colinérgicos sobre las aferentes glutamatérgicas estriatales es que la 4-AP disminuyera diferencialmente la sensibilidad de los canales iónicos a la modulación por carbacol. En apoyo a lo anterior, se ha reportado en preparaciones de sinaptosomas de estriado que la modulación colinérgica puede ser de hecho enmascarada por la administración de 4-AP (Fredholm, 1990). Asimismo, en otros tipos neuronales, la 4-AP también enmascara los efectos de moduladores tales como los agonistas α_2 -adrenérgicos. Este enmascaramiento parece deberse a que la 4-AP disminuye la sensibilidad de los canales de calcio tipo P/Q y N, así como de los canales de potasio activados por calcio (Barish

et al., 1996; Dolezal et al., 1996). Así, la 4-AP administrada junto con otros moduladores actuaría como un antagonista "funcional" de los agonistas responsables de disminuir la liberación presináptica del neurotransmisor en un porcentaje de las aferentes (Colmers et al., 1993; Lupica y Dunwiddie, 1993). Desconocemos, sin embargo, el mecanismo mediante el cual la acetilcolina lleva cabo la modulación presináptica.

Los receptores muscarínicos M_2 y M_3 median la modulación colinérgica sobre las aferentes glutamatérgicas neocorticales.

Para analizar el tipo de receptor muscarínico involucrado en la modulación presináptica, se utilizó el protocolo de pulsos pareados (PPF) en el que la aplicación consecutiva de dos estímulos subumbrales de la misma duración e intensidad genera la facilitación de la segunda respuesta. Este protocolo ha sido extensamente utilizado para analizar mecanismos de inhibición presináptica (Wu y Saggau, 1997), pues aquellas drogas que inhiben la liberación de neurotransmisor incrementan la PPF (Dunwiddie and Has, 1985; Kahle and Cotman, 1993; Andreasen and Hablitz, 1994; Kang, 1995). Los efectos generados por la estimulación de pulsos pareados se explican por la teoría del "calcio residual", en donde la PPF es el resultado de efectos aditivos del calcio que entra durante la primera y segunda respuesta (Dunwiddie and Lynch, 1978; Zucker, 1991; Wu and Saggau, 1994; Fleidervish and Gutnick, 1995; Kobayashi et al., 1995; Debanne et al., 1996).

En nuestros experimentos la administración de carbacol y muscarina (ambos agonistas muscarínicos) en las células estriatales incrementó la facilitación sináptica inducida por la estimulación de pulsos pareados (ver Fig. 12) (Andreasen y Hablitz, 1994). Si estos moduladores cambiaran la eficacia sináptica por otro mecanismo, por ejemplo cambios postsinápticos, ambas respuestas sinápticas deberían cambiar en la misma proporción (afectándose conductancias postsinápticas o cambiando la sensibilización de los receptores postsinápticos). En nuestros experimentos encontramos un cambio en la relación S_2/S_1 , incrementándose la amplitud de la

respuesta S_2 en comparación con la respuesta S_1 . Podría pensarse que el cambio en la amplitud de los potenciales se debió a una alteración en las propiedades de los receptores postsinápticos, como la desensibilización (Clemements, 1993). Sin embargo, los agonistas muscarínicos empleados no afectaron la resistencia de entrada de la membrana, ni las constantes de tiempo de caída de las respuestas sinápticas en ninguna condición experimental, sugiriendo que no hubo cambios postsinápticos y que el efecto es mediado presinápticamente

Por otro lado, la administración de atropina inhibió la facilitación observada en condiciones control generando, incluso, depresión sináptica; sugiriendo la existencia de liberación tónica endógena de acetilcolina en el neocórtex. En conjunto estas observaciones apoyan la idea de que la modulación colinérgica presináptica de las aferentes glutamatérgicas neocorticales es mediada por receptores muscarínicos. De acuerdo a esto, existe evidencia experimental previa que muestra como la activación muscarínica deprime la transmisión sináptica mediante mecanismos presinápticos en otras regiones cerebrales (Dutar y Nicoll, 1988, Nicoll et al., 1990; Kang, 1995; Scanziani et al., 1995; Vannuchi y Pepeu, 1995).

Empleando antagonistas específicos de los receptores $M_{1,4}$, M_2 y M_3 , se intentó identificar el tipo de receptor responsable de mediar los efectos de los agonistas muscarínicos. Dado que en otro tipo de neuronas se ha reportado que el receptor M_2 modula presinápticamente la liberación de neurotransmisores (Dutar y Nicoll, 1988; Mc Cormick, 1993; Quirion et al., 1993; Kang, 1995), decidimos probar si en las sinapsis glutamatérgicas del neocórtex este receptor estaba involucrado. Para documentar la participación de los receptores M_2 empleamos galamina (Kenakin and Boselli, 1989; Michel et al., 1990), AFDX-116 y 3- α -cloroimperialina (Baumgold et al., 1994), compuestos propuestos como antagonistas específicos del receptor M_2 . La galamina bloqueó la inhibición presináptica inducida por muscarina. El AFDX-116 bloqueó la PPF inducida por muscarina en aproximadamente un 65%, mientras que la 3- α -cloroimperialina bloqueó el

efecto muscarínico cerca del 100%. Esta discrepancia puede deberse a que estos fármacos tienen diferente especificidad para los receptores muscarínicos. Nuestras observaciones también apoyan que la 3- α -cloroimperialina no es tan específica para los receptores M_2 como previamente se había sugerido.

Estudios previos en el neocórtex sugerían que el receptor M_3 podría estar involucrado en la modulación presináptica (Sugita et al., 1993, Hsu et al., 1995). Estos estudios, sin embargo, se realizaron utilizando un tipo de 4-DAMP reversible (Barlow et al., 1991). Por lo tanto, en nuestros experimentos utilizamos la mostaza nitrogenada 4-DAMP irreversible específica para el receptor M_3 . Los resultados mostraron que este antagonista M_3 bloqueó la PPF inducida por muscarina en cerca del 70%.

Nuestros resultados muestran así que, los receptores M_2 y M_3 median la modulación presináptica colinérgica de las aferentes glutamatérgicas estriatales. En apoyo a esta conclusión, los coeficientes de Hill sugirieron la presencia de por lo menos dos tipos de receptores muscarínicos en las terminales glutamatérgicas neocórtex.

Debido a que el neocórtex recibe aferentes excitatorias provenientes del tálamo y de la corteza, nuestros hallazgos sugieren la posibilidad de que diferentes aferentes glutamatérgicas puedan tener distintos receptores muscarínicos. En apoyo a la presencia presináptica de los receptores colinérgicos m_2 y m_3 , estudios anatómicos han mostrado su existencia en las terminales nerviosas. En contraste, los receptores m_1 y m_4 se han localizado en las dendritas y densidades postsinápticas de las neuronas espinosas medianas (Hersch et al., 1994; Levey et al., 1994; 1997).

Posibles mecanismos de modulación.

Los moduladores presinápticos disminuyen la liberación de neurotransmisor inhibiendo canales de calcio y/o activando canales de potasio (Wu y Saggau, 1997). Algunos estudios han mostrado que el grado de facilitación del PPF es mejor en condiciones de bajo calcio y alto

magnesio (Dunwiddie y Haas, 1985; Andreassen y Hablitz, 1994, Fleidervish y Gutnick, 1995, Igelmund y Heinemann, 1995). La disminución de la concentración de calcio extracelular disminuye la probabilidad de liberación del neurotransmisor ante el primer estímulo, sin embargo el calcio residual que esta deja, junto con el que entra debido al segundo estímulo se suman, provocando que la segunda respuesta sea mayor que la primera. Por lo que es probable que la activación de los receptores muscarínicos al actuar de la misma manera, bloqueen la entrada de calcio a la terminal. Así, es posible que en nuestros experimentos los agonistas muscarínicos inhibieran los canales de calcio dependientes de voltaje involucrados en la liberación del neurotransmisor. En apoyo a esta posibilidad, se ha documentado que la acetilcolina disminuye corrientes de calcio (Williams y Johnston, 1993). De manera que si la ACh previene la entrada de calcio a la terminal, es posible que las proteínas involucradas en el anclaje y la fusión vesicular como la sinaptotagmina, sinaptobrevina y sinaptofisina, alteren su función impidiendo la liberación del neurotransmisor por un bloqueo de la exocitosis (Hunt et al ,1994; Burns and Agustine 1995, Sudhof, 1995). Asimismo, la fosforilación de sinapsina dependiente de calcio producida por la enzima CaMKII podría prevenirse, reduciendo la disponibilidad de las vesículas en la poza de reserva (Llinás et al., 1991 Rosahl et al., 1993)

Un mecanismo adicional para explicar nuestros resultados es que la estimulación muscarínica activara canales de potasio en las terminales glutamatérgicas. En otros tipos celulares, se ha documentado que la estimulación muscarínica incrementa conductancias de potasio y corrientes de potasio activadas por calcio (Van Dongen et al., 1988; Sah, 1996). Los canales de potasio tipo Kv y aquellos activados por Ca^{2+} existen en terminales presinápticas y están involucrados en la liberación del neurotransmisor (Robitaille and Charlton, 1992; Robitaille et al , 1993; Knaus et al., 1996; Roeper and Pongs, 1996) Si la ACh activa canales de K^+ , la depolarización de la terminal sináptica puede prevenirse o decrementarse reduciendo la entrada de

calcio y la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Ohno-Shosaku et al., 1996). En ambos casos, el evento final es la disminución de la entrada de Ca^{2+}

Los receptores muscarínicos M_2 inhiben la vía metabólica asociada a la enzima adenilato de ciclasa. En la amígdala (Huang et al., 1996) y en la región CA3 del hipocampo (Weisskopf et al., 1994) se ha documentado que la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) modula la transmisión glutamatérgica (Huang et al., 1996). En estas áreas, agentes farmacológicos que afectan la actividad de la PKA cambian la magnitud de la PPF, sugiriendo que la PKA es una de las enzimas responsables de la modulación de la transmisión glutamatérgica. Por lo tanto, los agonistas muscarínicos podrían bloquear las sinapsis glutamatérgicas en el estriado disminuyendo al AMPc y decrementando la actividad de la PKA. Una vía alternativa de modulación sería a través de proteínas G que incrementan directamente la actividad de los canales de K^+ y decrementan la de canales de calcio (Nicholls, 1994)

Los receptores M_3 , por otro lado, están relacionados con la vía de los fosfoinosítidos (McKinney, 1993). La estimulación de los receptores M_3 activa a las fosfolipasas C (PLC) y D (PLD). La PLC produce movilización de calcio de pozas intracelulares (Guo et al., 1996; Prakriya et al., 1996). La PLD media el tráfico vesicular (Klein et al., 1996). Así, es posible que la estimulación por ACh afecte tanto la movilización de calcio de las pozas intracelulares, como la fusión vesicular actuando sobre la PLC y la PLD, respectivamente. El diacilglicerol activa a la proteína cinasa C (PKC) y se ha observado que la PKC media varios efectos muscarínicos (Malenka et al., 1986) como es la activación de corrientes de K^+ dependientes de voltaje (Zhang et al., 1992). Es probable que la PKC participe en la modulación presináptica generada por ACh a través de receptores M_3 .

La liberación del neurotransmisor es mediada por procesos relacionados o no a la activación de canales dependientes de voltaje (Capogna et al., 1996) Los potenciales sinápticos

provocados son dependientes de la entrada de calcio. Sin embargo, la liberación espontánea o "cuántica" del neurotransmisor es independiente del calcio extracelular. Nuestros experimentos de PPF sugieren que la modulación muscarínica presináptica de la liberación de glutamato es dependiente del calcio extracelular. Cabe la posibilidad, sin embargo, de que la actividad colinérgica neocortical module la liberación espontánea del neurotransmisor tal y como ocurre en la liberación inducida por 4-AP.

Con base en nuestros resultados podemos afirmar que los efectos presinápticos son mediados por receptores tipo M_2 y M_3 , en tanto que a nivel postsináptico los receptores responsables de la modulación muscarínica son los receptores del tipo M_1 y M_4 (Pineda et al., 1995; datos no publicados del laboratorio). Es importante mencionar que las dosis necesarias para producir modulación presináptica en nuestros estudios estuvieron por debajo de las que comúnmente se requieren para producir cambios postsinápticos (Pineda et al., 1995; Hernández-López et al., en prensa). Lo que sugiere que los receptores presinápticos pueden tener alta afinidad por sus ligandos, y que la modulación presináptica selecciona la aferente necesaria para la integración sináptica en el estriado en un momento dado.

Relación anatómica entre las interneuronas colinérgicas y las terminales glutamatérgicas.

Desconocemos si la modulación colinérgica sobre las aferentes glutamatérgicas es sináptica o parasináptica. Desde el punto de vista anatómico se sabe que los botones sinápticos de las células colinérgicas se encuentran en gran cantidad en la matriz neocortical, y que la matriz recibe principalmente aferentes de la corteza (Wilson, 1990). El tipo de contactos que establecen las células colinérgicas dentro del estriado parecen ser simétricos (Bolam et al., 1990). En algunos estudios se observaron pocos contactos dendríticos yuxtapuestos, por lo que se ha sugerido que la transmisión colinérgica es de volumen (Contant et al., 1996). La figura 22 resume algunos de los mecanismos de modulación que podrían observarse en las terminales glutamatérgicas

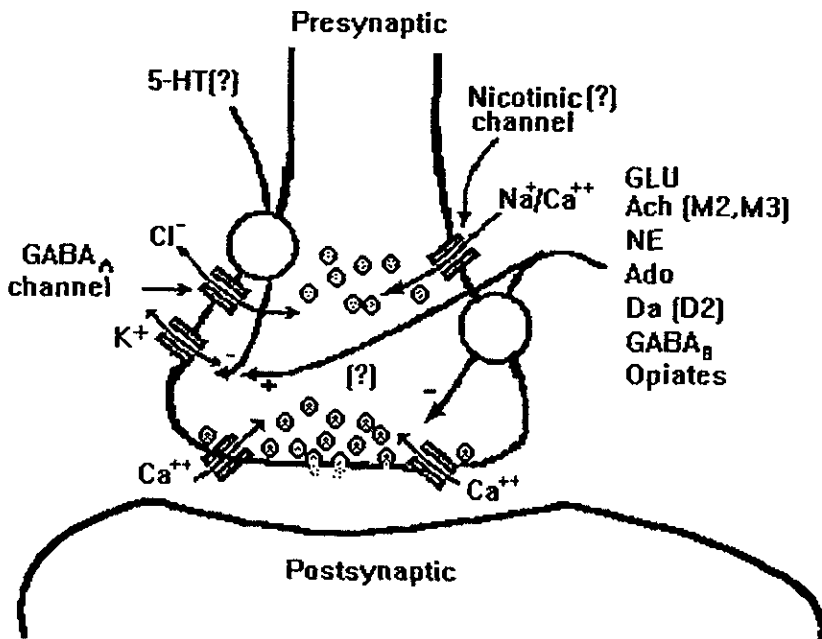


Fig.23 Representación esquemática de los moduladores presinápticos que se encuentran en las terminales glutamatergicas. Los receptores muscarínicos podrían inhibir la entrada de calcio y bloquear el proceso de exocitosis, o bien activar canales de potasio y así acortar el potencial de acción lo cual disminuiría la probabilidad de apertura de los canales de calcio.

Los canales de calcio tipo N y P/Q participan en el control de la liberación de glutamato en el estriado.

En nuestros experimentos encontramos que la ω -AgaTx-IVA, ω -ConoTx-VIA y la ω -ConoTx-MVIIC afectan el potencial sináptico provocado en proporciones semejantes. Sin abolir completamente la actividad sináptica. Este fenómeno fue evidenciado, en mayor grado, en condiciones supraumbrales de estimulación en donde la ω -ConoTx-VIA no elimina el potencial ortodrómico, y requiere de la presencia de ω -AgaTx-IVA para disminuir la liberación. Al igual que los experimentos de Wheeler et al; (1994), la acción de la ω -ConoTx-VIA fue rápida pero moderada. Este grupo no encontró efectos de la ω -AgaTx-IVA en el hipocampo, pero las dosis empleadas fueron bajas (30nM) El incremento de la dosis a 200nM, sin embargo, inhibe la liberación del neurotransmisor. Resultados semejantes habían sido descritos por Turner et al; (1993) en sinaptosomas de estriado. Lovinger et al; (1994) reportaron datos similares con respecto a la ω -ConoTx-MVIIC. Sin embargo, el bloqueo de los canales tipo N disminuyó significativamente la liberación de glutamato, mientras que la inhibición de los canales tipo P no tuvo un efecto importante sobre la transmisión glutamatérgica. Estudios recientes sugieren que la ω -AgaTx-IVA además de bloquear los canales P afecta, en dosis mayores (>100nM), a los canales Q. No obstante aún existe controversia acerca de cual es la concentración específica para bloquear los canales P. El efecto observado con ω -ConoTx-MVIIC indica que otros canales de calcio como los Q (Wheeler et al., 1994), y los R (Wu y Saggau, 1995) pudieran estar involucrados en la liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales. Sin embargo se sabe que esta toxina al igual que la ω -AgaIIIA también bloquea otros subtipos de canales como los L, N, y P (Adams y Olivera, 1994). Nuestros resultados demostraron que mas de un canal de calcio es responsable de la liberación de glutamato en el neostriado, a saber, canales N, P/Q y posiblemente el R.

Estudios previos habían sugerido que en anfibios y aves, los canales tipo N (Robitaille et al., 1990; Robitaille et al., 1993; Fossier, 1994; Yawo y Chuhma, 1994), y los P en mamíferos, participan en el control de la liberación del neurotransmisor (Hong y Chang, 1995; Mintz et al., 1995). No obstante nuestros resultados así como los de otros grupos demuestran que en mamíferos participan tanto canales N como P.

Es posible que estos canales sean los blancos de diferentes moduladores que actúan sobre receptores presinápticos de las terminales glutamatérgicas en el estriado. Sin embargo su participación en el control de la liberación podría ser regulado diferencialmente por distintos moduladores o receptores. Experimentos futuros deberán responder esta pregunta.

Importancia Clínica

Se ha sugerido por largo tiempo que los ganglios basales modulan la función tálamocortical y que cuando hay una alteración en alguno de sus circuitos se observan alteraciones motoras. La neuromodulación en el estriado tomó interés cuando se encontró que en la enfermedad de Parkinson había una alteración en la vía nigroestriatal dopaminérgica y que ésta producía hipocinesia. Aunado a este hallazgo se observó que la disminución colinérgica producía hipercinesia. Fue entonces que se propuso que debía existir un balance entre estos dos sistemas de modulación. Desde el punto de vista terapéutico la atención se ha focalizado sobre análogos de dopamina (v.g. L-DOPA) para disminuir los síntomas del parkinsonismo (Carlsson y Carlsson, 1990) y recientemente sobre antagonistas no competitivos de los receptores glutamatérgicos NMDA, pues el decremento glutamatérgico parece ser un factor determinante en la patofisiología de la enfermedad de Parkinson así como de otras alteraciones como la esquizofrenia (Lovinger y Lambert, 1993; Rieder et al., 1993). Sin embargo, poca atención se ha puesto al papel de la modulación colinérgica en la patofisiología neostriatal (Stoof et al., 1992). Se sabe que la administración conjunta de antagonistas NMDA, agonistas catecolaminérgicos y antagonistas

colinérgicos producen un efecto terapéutico con pocos efectos colaterales (Carlsson y Carlsson, 1990). Las fibras colinérgicas son predominantemente invadidas por fibras que provienen del tálamo. Si estas entradas son glutamatérgicas, las fibras talamoestriatales podrían modular la actividad de las interneuronas colinérgicas a través de receptores NMDA quienes, en turno, pudieran ser los responsables de la liberación de ACh en el estriado (Kawaguchi et al., 1995). Si uno de los factores que mejoran el curso de la enfermedad es la disminución de la liberación glutamatérgica, la administración selectiva de agonistas muscarínicos presinápticos, podrían regular la liberación de glutamato y mejorar la patofisiología de la enfermedad.

Los estudios electrofisiológicos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la actividad de las células neostriatales depende de la entrada excitatoria (Calabresi et al., 1990a; Wilson y Kawaguchi, 1996). Esta entrada, puede generar un estado de actividad o de inactividad (ver antecedentes). El efecto de diferentes moduladores sobre las células estriatales, dependerá de cual sea el estado en que se encuentran las neuronas espinosas medianas. Además los moduladores como la acetilcolina actúan sobre receptores presinápticos y postsinápticos. A nivel presináptico la estimulación de los receptores tipo M_2 y M_3 disminuyen la liberación de glutamato, en tanto que a nivel postsináptico decrementan el pospotencial de las células espinosas medianas e incrementan la frecuencia de disparo y este efecto es mediado por receptores M_1 y M_4 . Estos hallazgos podrían tener importancia terapéutica, por ejemplo, uno podría usar agonistas tipo M_2 y M_3 para el control de la excitación neostriatal que se presenta en la corea de Huntington en donde las células GABAérgicas de proyección están degenerando.

La manipulación específica de los subtipos de receptores permitirá tener alternativas terapéuticas para la patofisiología estriatal, modulando desde la presinapsis la actividad glutamatérgica estriatal.

8 Conclusiones

- 1 -Las aferentes glutamatérgicas al neostriado son moduladas por la acetilcolina.
- 2 -La modulación colinérgica presináptica de las aferentes glutamatérgicas es mediada por los receptores muscarínicos tipo M_2 y M_3 .
- 3 -Los canales de calcio involucrados en el control de la liberación de glutamato en las terminales glutamatérgicas estriatales son del tipo N y P/Q

9 Referencias

- Adams M.E., Olivera B.M. (1994) Neurotoxins: overview of an emerging research technology. *TINS.*, 17: 151-155.
- Akaike A., Ohno T., Sasa M., Takaori 1987. Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of the caudate *in vitro* *Brain Res.*, 418: 262-272
- Albin R.L., Young A.B., Penney J.P. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders *TINS.*, 12:366-375.
- Alexander G.E., De Long M.R., Strick P.L (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann. Rev. Neurosci.*, 9:357-381
- Allgaier C., Daschmann B., Huang H.Y., Hertting G. (1988). Protein kinase C and presynaptic modulation of acetylcholine release in rabbit hippocampus. *Br J Pharmacol.*, 93: 525-534.
- Aikondon M., Rocha E.S., Maelcke A., Albuquerque E.X. (1996). Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. V. α -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 278: 1460-1471
- Allen T.G.J., Brown D.A (1993) M₂ muscarinic receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones *J. Physiol.*, 466: 173-189
- Ambrosio A.F., Malva J.O., Carvalho A.P., Carvalho C.M (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by activation of adenosine A₁ receptors in rat striatal glutamatergic nerve terminals. *220*: 163-166.
- Andreasen M., Hablitz J.J. (1994) Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: A patch clamp study in rat hippocampus *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, 72: 326-336
- Bargas J., Galarraga E., Aceves J (1988). Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp. Brain Res.*, 72: 390-398.
- Bargas J., Galarraga E., Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain Res.*, 75: 146-156.
- Barlow R.B., Mc Millen L.S., Veale M.A (1991). The use of 4-diphenylacetoxy-N-(2-chloroethyl)-piperidine (4-DAMP) for estimating the apparent affinities of some agonist acting at muscarinic receptors in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 102, 657-662.
- Baskys B.A., Malenka R.C. (1991). Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.*, 444: 687-701.
- Baumgold J., Pryzbyc R.L., Reba R.C. (1994). 3- α -Chlorimperialinc, an M₂-selective muscarinic receptor antagonist that penetrates into brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 251: 315-317
- Bindokas V.P., Venema V.J., Adams M.E. (1991). Differential antagonism of transmitter release by subtypes of ω -Agatoxins *J Neurophysiol.*, 66:590-601.

- Bolam J.P., Ingham C.A., Smith A.D. (1984a). The section-Golgi-impregnation procedure-3. Combination of Golgi-impregnation with enzyme histochemistry and electron microscopy to characterize acetylcholinesterase-containing neurons in the rat neostriatum. *Neuroscience*, **12**: 687-709.
- Bolam J.P., Wainer B.H., Smith A.D. (1984b) Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*, **12**: 711-718
- Bonner T I (1989). The molecular basis of muscarnic receptor diversity. *TINS.*, **12**: 148-151.
- Boehm S. y Huck S. (1996). Inhibition of N-type channels: the only mechanism by which alpha 2-autoreceptors control sympathetic transmitter release. *Eur J. Neurosci.*, **8**:1924-1931
- Boehms S. Betz H., (1997). Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors *J. Neurosci.*, **17**: 4066-4075.
- Buchwald N.A., Price D.D., Vernon L., Hull C.D. (1973). Caudate intracellular response to thalamic and cortical inputs. *Exp. Neurol.*, **38**: 311-323
- Buckle P.J., Haas H.L. (1982). Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol.*, **326**: 109-122.
- Burns M.E., Augustine G. J. (1995). Synaptic structure and function: Dynamic organization yields architectural precision. *Cell* **83**: 187-194
- Byrne J.H., Kandel E.R. (1996). Presynaptic facilitation revisited: State and time dependence. *J Neurosci.*, **16**: 425-435.
- Calabresi P., Mercuri N.B., Stefani A., Bernardi G. (1990a) Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. I. An *In vivo* analysis. *J. Neurophysiol.*, **63**: 651-662.
- Calabresi P., Mercuri N.B., Bernardi G (1990b). Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. I. An *In vivo* analysis *J Neurophysiol.*, **63**: 663-675.
- Calabresi P., De Murtas M.D., Mercuri N.B., Bernardi G. (1990c). Kainic acid on neostriatal neurons intracellularly record in vitro: Electrophysiological evidence for differential neuronal sensitivity. *J.Neurosci.*, **10**:3960-3969.
- Calabresi P., Maj R., Pisani A., Mercuri N.B., Bernardi G. (1992). Long-term synaptic depression in the striatum: Physiological and pharmacological characterization. *J.Neurosci.*, **12**:4224-4233.
- Calabresi P., Mercuri N.B., Bernardi G. (1993). Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog. Brain Res.*, **99**: 299-308.
- Calabresi P., Pisani A., Mercuri N.B., Bernardi G., (1996). The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia *TINS.*, **19**: 19-24.
- Capogna M., Gähwiler B.H., Thompson S.M. (1996). Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and α -latrotoxin in the hippocampus *J Neurophysiol.*, **75**: 2017-2028

- Carlsson A. (1975). Receptor mediated control of dopamine metabolism: En *Pre-and postsynaptic receptors*. Usdin E., Bunney B., Bunney E.E. Eds N.Y. Marcel Dekker
- Carlsson M., Carlsson A. (1990). Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *TINS* 13:272-276.
- Catsicas S., Grenningloh G, Pich E. M. (1994). Nerve terminal proteins: To fuse to learn. *TINS.*, 17: 368-373.
- Cauldfield M.P., Robbins J., Higashida H., Brown D.A. (1993). Postsynaptic actions of acetylcholine: the coupling of muscarinic receptor subtypes to neuronal ion channels. *Prog. Brain Res.*, 98: 293-301.
- Clements J. (1993) Presynaptic receptors and quantal models of synaptic transmission. En *Presynaptic receptors in the mammalian brain* T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp. 27-41.
- Creager R., Dunwiddie T., Lynch G. (1980). Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the *in vitro* rat hippocampus. *J. Physiol.*, 299: 409-424.
- Cherubini E., Herling P.L., Lanfumey L., Stanziones P. (1988). Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones *in vitro*. *J Physiol* , 400: 677-690
- Cohen G.A., Doze V.A., Madison D.V. (1992). Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron* 9:325-335.
- Colmers W.F., McQuiston A.R., Kobian S.B., Klapstein G.J. (1993). Presynaptic inhibition mediated by neuropeptide Y in the mammalian CNS: Possible physiological implications. En *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp. 87-103.
- Contant C., Umbriaco D., Garcia S., Watkins K.C, Descarries L. (1996). Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience*, 71: 937-947.
- Cooper J.R., Zoltay G. (1990). The ionic basis of inhibitory presynaptic modulation and substance B. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 604: 96-101.
- Debanne D., Guérineau N.C, Gähwiler B.H., Thompson S.M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J.Physiol.*, 491.1:163-176.
- De Camilli P. y Jahn R. (1990). Pathways to regulate exocytosis in neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, 52: 625-645.
- De Waard M., Gurnett C.A., Campbell K.P. (1996). Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels En *Ion Channels* vol 4 Edit. Toshio Narahashi. Plenum Press N.Y., pp 41-87.
- De Long M R (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS* 13:281-285

- Di Chiara G., Morelli M. (1993). Dopamine acetylcholine glutamate interactions in the striatum A working hypothesis. *Adv. Neurol.*, 60: 102-106.
- Dingledine R., McBain. (1994) Excitatory Amino Acid Transmitters. *En Basic Neurochemistry*. Edits Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Molinoff P.B. 5a Edición, pp. 367-387.
- Dittman J.S. Regehr W.G. (1996) Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.*, 16: 1623-1633.
- Dotz H.U., Misgeld U. (1986). Muscarinic slow excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum. *J. Physiol.*, 380: 593-608.
- Dolezal V., Huang H.Y., Schobert A., Hertting G. (1996). 3,4-Diaminopyridine masks the inhibition of noradrenaline release from chick sympathetic neurons via presynaptic alpha 2-adrenoreceptors: insights into the role of N- and L-Type calcium channels. *Brain Res.*, 721:101-110.
- Dunwiddie T.V., Lynch G. (1978). Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: Localization and frequency dependency. *J. Physiol.*, 276: 353-367.
- Dunwiddie T.V., Haas H.L. (1985). Adenosine increases synaptic facilitation in the *in vitro* rat hippocampus: Evidence from a presynaptic site of action. *J. Physiol.*, 369: 365-377.
- Dutar P., Nicoll R.A. (1988) Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messenger systems: Electrophysiological studies *in vitro*. *J. Neurosci.*, 8: 4214-4224.
- Dutar P., Nicholl R.A. (1993) GABA_B receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the hippocampus: Pharmacology and intracellular mechanisms. *En Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhauser, Boston pp. 15-26.
- Fang Y., Durgierian S., Basarsky T.A., Haydon P.G. (1994). GTP-binding proteins: necessary components of the presynaptic terminals for synaptic transmission and its modulation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, 29:121-132
- Fisher S.A., Fisher T.M., Carow T.J. (1997). Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *TINS*: 20: 170-177
- Fleiderovich I.A., Gutnick M.J. (1995). Paired-pulse facilitation of IPSCs in slices of immature and mature mouse somatosensory neocortex. *J. Neurophysiol.*, 73: 2591-2595.
- Floran B., Silva I., Nava C., Accves J. (1988). Presynaptic modulation of the release of GABA by GABAA receptors in pars compacta and by GABAB receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur J. Pharmacol.*, 150: 277-286
- Flores-Hernández J., Galarraga E., Pinoda J.C., Bargas J. (1994). Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J. Neurophysiol.*, 72: 2246-2256.
- Flores-Hernández J., Galarraga E., Bargas J. (1997). Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25: 185-195

- Fonnum F., Storm-Mathisen J., Divac Y. (1981). Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in cortico-striatal and corticothalamic fibre in rat brain. *Neurosci.*, 6: 863-873.
- Fossier P., Baux G., Tauc L. (1993a). Role of different types of Ca²⁺ channels and a reticulum-like Ca²⁺ pump in neurotransmitter release. *J. Physiol.*, 87: 3-14.
- Fossier P., Baux G., Tauc L. (1993b). N- and P-type Ca²⁺ channels are involved in acetylcholine release at a neuromuscular synapse: Only the N-type channel is the target of neuromodulators. *Proc. Natl. Sci. USA.*, 91: 4771-4775.
- Frehholm B.B. (1990). Differential sensitivity to blockade by 4 aminopyridine of presynaptic receptors regulating (³H) acetylcholine release from hippocampus. *J. Neurochem.*, 54:1386-1390.
- Gallarraga E., Bargas J., Sierra A., Aceves J. (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Expe Res.*, 75: 157-168.
- Gallarraga E., Pacheco-Cano, Flores-Hernández J.V., Bargas J. (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp. Brain Res.*, 100: 239-249
- Gerfen C.R. (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15:285-320.
- Gitler M.S., Boulay S.F., Sood V.K., McPherson D.W., Knap F.F., Zeeberg B.R., Reba R.C. (1995). Characterization of in vivo brain muscarinic acetylcholine receptor subtype selectivity by competition studies against (*R,S*)-[125I]IQNB. *Brain Res.*, 687: 71-78.
- Graybiel A.M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *TINS* 13: 244-254.
- Groves P.M., (1983). A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res. Rev.*, 5: 109-132.
- Grunar W. y Silva L.R. (1994). Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J. Neurosci.*, 14:2800-2808.
- Goldman-Rakic P.S., Selemon L.D. (1990). New frontiers in basal ganglia research. *TINS* 13: 241-244.
- Gotow T. (1992) The cytoplasmic structure of axon terminal. *Prog. Neurobiol.*, 39: 443-474.
- Guido M., Giardi M., Raiteri M. (1988). Release-regulating D₂ dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 47:680-684.
- Hammer R., Berrie C.P., Birdsall N.M.J., Burgon A.S.V., Hulme E.C. (1980). Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptor. *Nature* 283:90-92.
- Hammond C. (1996a). The chemical synapses. En *Cellular and molecular neurobiology*. C.Hammond Eds. Academic Press Londres. pp:20-46
- Hammond C. (1996b). Neurotransmitter release. En *Cellular and molecular neurobiology* C.Hammond Eds. Academic Press Londres. pp.188-213.

- Herlitze S., García D.E., Mackie K., Hille B., Scheuer T., Catterall W.A. (1996). Modulation of Ca²⁺ channel by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:6571, 258-262.
- Hernández-Lopez S., Bargas J., Surmeier J., Reyes A., Galarrraga E. (1997). D₁ receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J.Neurosci.*, 17: 3334-3342.
- Herrero J., Vázquez E., Miras-Portugal M.T., Sanchez-Prieto J. (1996). Decrease in Ca²⁺ but not in cAMP mediates L-AP4 inhibition of glutamate release PKC mediated supression of this inhibitory pathway. *Eur.J.Neurosci.*, 8:700-709.
- Herrling P.L. (1985). Pharmacology of the corticocaudate excitatory post synaptic potential in the cat: evidence for its mediation by quisqualate or kainate receptors. *Neurosci* , 14: 417-426.
- Hersch S.M., Gutekunst C.A., Rees H.D., Heilman C.J., Levey A.I. (1994) Distribution of m₁-m₄ muscarinic receptor proteins in the rat neostriatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J.Neurosci.*, 14:3351-3363.
- Hille B., (1992). Modulation, slow synaptic action and second messenger. En: *Ion Channels of Excitable Membranes*. Ed. Hille B. Sinauer:Suderland, MA. pp. 170-199
- Horikawa A.and Armstrong W.E. (1988). A versatile means of intracelular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J.Neurosci.Methods*. 25:1-11
- Hong S.J., Chang C.C. (1995). Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, ω-agatoxin IVA. *J. Physiol.*, 482: 283-290.
- Howe A.R., Surmeier D.J. (1995). Muscarinic receptor modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J. Neurosci.*, 15: 458-469.
- Hsu K.S., Huang C.C., Yang C.H., Gean P.W. (1995). Presynaptic D₂ dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic trasmission in rat neostriatum. *Brain Res.*, 690: 264-268.
- Hsu K.S., Huang C.C., Gean P.W. (1995b). Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M₃ receptors in the rat neostriatum. *Neurosci. Lett.*, 197: 141-144.
- Huang C.C., Hsu K.S., Gean P.W. (1996). Isoproterenol potentiates synaptic transmission primarily by enhancing presynaptic calcium influx via P and/or Q type calcium channels in the rat amygdala. *J.Neurosci.*, 16:1026-1033.
- Hunt J.M., Bommert K., Charlton M.P., Kistner A., Habermann E., Augustine G.J., Betz H. (1994). A post docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Nature* 12: 1269-1279.
- Igelmund P., Heineman U. (1995). Synaptic transmission and paired-pulse behaviour of CA1 pyramidal cells in hippocampal slices from a hibernator at low temperature: importance of ionic environment. *Brain Res.*, 689: 9-20.
- Jackson H, Usherwood P.N.R. (1988). Spider toxins as tools for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. *TINS.*, 11. 278-283.

- Jahn R. (1994). Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 219-246.
- Jakab R.L., Goldman-Rakic P. (1996). Presynaptic and postsynaptic subcellular localization of substance P receptor immunoreactivity in the neostriatum of the rat and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.*, 369:125-136
- Jonhson S.W., North A. (1993). Presynaptic actions of opioids. En: *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp. 71-86.
- Jiang Z.G., North A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons *in vitro*. *J. Physiol.*, 443:533-553.
- Jonhston D, Miao-Sin Wu S., (1995). Synaptic transmission and presynaptic mechanism. En: *Foundations of the Cellular Neurophysiology* Ed. Jonshon D. MIT Press. New York. pp: 287-317.
- Kang Y. (1995). Differential paired pulse depression of Non-NMDA and NMDA currents in pyramidal cells of the rat frontal cortex. *J. Neurosci.*, 15: 8268-8280
- Kahle J.S., Cotman C.W. (1993). Adenosine, L-AP4, and baclofen modulation of paired-pulse potentiation in the dentate gyrus: interstimulus interval-dependent pharmacology. *Exp. Brain Res.*, 94: 97-104.
- Katz B. and Miledi R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.*, 195: 481-492.
- Kawaguchi Y. (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.*, 13. 4908-4923
- Kawaguchi Y., Wilson C.J., Emson P.C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 10:3421-3438.
- Kawaguchi Y. y Kubota (1994). Local circuit neurons in the frontal cortex and the neostriatum 73-88
- Kawaguchi Y., Wilson C.J., Augood S.J., Emson P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS*, 18: 527-535.
- Kenakin T. and Boselli C. (1989). Pharmacologic discrimination between receptor heterogeneity and allosteric interaction: Resultant analysis of gallamine and pirenzepine antagonist of muscarinic in rat trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250: 944-952.
- Kennedy M B. (1994). The biochemistry of synaptic regulation in the central nervous system. *Ann. Rev. Biochem.*, 63:571-600.
- Kita T., Kita H., Kitai T. (1984). Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparations. *Brain res.*, 300:129-139.
- Kita T., Kita H., Kitai S.T. (1985a). Effects of 4-Aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. *Brain Res.*, 361:10-18
- Kita H., Kita T., Kitai S.T. (1985b) Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. *Exp. Brain Res.*, 60:54-62

- Kitai S.T., Surmeier D.J. (1993). Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.*, **60**: 40-53
- Kita H. (1993). GABAergic circuits of the striatum. *Prog. Brain Res.*, **99**:51-72.
- Klein J., Lindmar R., Löffelholz K. (1996). Muscarinic activation of phosphatidylcholine hydrolysis. *Prog. Brain Res.*, **109**:201-208.
- Kobayashi K., Sakaba T., Tachibana M. (1995). Potentiation of Ca²⁺ transients in the presynaptic terminals of gold fish retinal bipolar cells. *J. Physiol.*, **482**: 7-13.
- Krnjevic K. (1993). Central cholinergic mechanisms and function. *Prog. Brain Res.*, **98**: 285-301.
- Kuno M. (1995). The Synapse. En: *The synapse: Function, plasticity, and neurotrophism*. Oxford University Press. N.Y. pp:3-84
- Lambert N.A. Harrison N.L. (1993). GABA_B receptors on inhibitory neurons in the hippocampus. En: *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhauser, Boston pp. 143-160.
- Langer S.Z. (1980). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Rev.*, **32**: 337-362.
- Langer S.Z., Arbilla S. (1981). Presynaptic receptors and modulation of the release of noradrenaline, dopamine and GABA. *Posgrad. Med J.*, **57** suppl 1:18-29.
- Léna C. and Changcux J.P. (1997). Role of Ca²⁺ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J. Neurosci.*, **17**:576-585.
- Levey A.I., Edmunds S.M., Heilman C.J., Desmond T.J., Frey K.A. (1994). Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neurosci.*, **63**. 207-221.
- Levtov A., Meyers D.E., Burke R.E. (1988). Activation of type B-gamma aminobutyric acid. receptors in the intact mammalian spinal cord mimics the effects of reduced presynaptic Ca²⁺ influx. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, **14**: 5330-5334.
- Littleton J.T., Bellen H.J. (1995). Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca²⁺-dependent manner. *TINS.*, **18**: 177-183
- Löffelholz K. (1996). Muscarinic receptors and cell signalling. *Prog. Brain Res.*, **109**. 191-199.
- Lovinger D.M. (1991). trans-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (t-ACDP) decreases synaptic excitation in rat striatal slice through a presynaptic action. *Neurosci. Lett.*, **129**:17-21.
- Lovinger D.M., Tyler E., Fidler S., Merritt A. (1993). Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J Neurophysiol* , **69**:1236-1244.

- Lovinger D.M. Lambert N A (1993b). Glutamate autoreceptors in mammalian brain. En: *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp. 127-142.
- Lovinger D.M., Merritt A., Reyes D. (1994). Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neurosci.*, **62**: 31-40.
- Lovinger D.M. y Tyler E. (1996). Synaptica transmission and modulation in the neostriatum. *Intern Rev.Neurobiol* , **39**:77-111.
- Lupica C.R., Dunwiddie T.V. (1993). Adenosine modulation of glutamate-mediated synaptic transmission in the Hippocampus. En: *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp: 104-126
- Llinás R., Sugimori M., Hillman D.E , Cherksey B. (1992a). Distribution and functional significance of P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *TINS.*, **15**: 351-355
- Llinás R, Sugimori M., Silver R.B. (1992b). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* **256**: 677-679.
- Llinás R., Sugimori M, Silver R.B (1995) The concept of Calcium concentration microdomains in synaptic transmission *Neuropharmacol.*, **34**: 1443-1451.
- Majewski H. (1983). Modulation of noradrenaline release through activation of presynaptic beta-adrenoreceptors. *J.Auton. Pharmacol.*, **3**:47-60.
- Malenka R.C., Madison D.V., Andrade R, Nicoll R.A. (1986). Phorbol esters mimic some cholinergic actions in hippocampal pyramidal neurons. *J.Neurosci.*, **6**:475-780
- Malenka R.C. and Kocsis J.D. (1988). Presynaptic actions of carbachol and adenosine on cortical synaptic transmission studied *in vitro* *J.Neurosci.*, **8**:3750-3756
- McCleskey E.W (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opinion Neurobiol.*, **4**:304-312
- McCormick D.A. (1993). Action of acetylcholine in the cerebral cortex and thalamus, and implications for function. *Prog. Brain Res.*, **98**: 303-307.
- McCormick D.A. (1990). Membrane properties and neurotransmitter actions. En: *Synaptic Organization of the Brain* Ed. Sheperd G.M. Oxford University Press: New York.pp: 32-66
- McGeer P.L., McGeer E G (1993). Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. *Adv. Neurol.*, **60**:93-101.
- McKinney M (1993). Muscarinic receptor subtypes-specific coupling to second messengers in neuronal systems. *Prog Brain Res.*, **98**: 333,340
- Michel A.D., Delmendo R.E., López M., Whiting R.L (1990). On the interaction of gallamine with muscarinic receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.*, **182**. 335-345

- Miljanich G.P. y Ramachandran J. (1995). Antagonists of neuronal calcium channels: Structure, function, and therapeutic Implications. *Annu.Rev. Pharmacol. Toxicol* , 35:707-734.
- Mintz I.M., Sabatini B.L., Regehr W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15: 675-688.
- Mitchell R. (1980). A novel GABA receptor modulates stimulus-induced glutamate release from cortico-striatal terminals. *Eur.J.Pharmacol.*, 3:119-122
- Misguel U., Wagner A., Ohno T. (1982). Depolarizing IPSPs and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Exp. Brain Res.*, 45: 108-114.
- Mori A., Takahashi T., Miyashita Y., Kasai H. (1994). Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurons of neonatal rats and paired pulse depression. *J.Physiol.*, 476:217-228.
- Mori A, Shindou T., Ichimura M., Nonaka H., Kase H. (1996). The role of adenosine A_{2a} receptors in regulating GABAergic synaptic transmission in striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci* , 16: 605-611.
- Mouginot D. and Gähwiler B.H. (1996). Presynaptic GABA_B receptors modulate IPSPs evoked in neurons of deep cerebellar nuclei in vitro *J. Neurophysiol.*, 75:894-901
- Nicholls D. (1994). Mechanism of exocytosis. En: *Protein transmitters and synapses*. Ed: Blackwell. Cambridge University Press, Cambridge pp: 110-138
- Nicholls J.G., Martin A.R. Wallace B.C. (1992) Principles of synaptic transmission En: *From Neuron to Brain*. 3era. Edición Sinauer Ass. Inc. pp:184-233.
- Nicoll R.A., Malenka R.C., Kauer J.A. (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, 70: 513-565.
- Nisenbaum E.S., Berger T.W., Grace A.A. (1993). Depression of glutamatergic and GABAergic synaptic responses in striatal spiny neurons by stimulation of presynaptic GABA_B receptors. *Synapse* 14: 221-242.
- Nisenbaum E.S., Xu Z.C., Wilson C.J. (1994). Contribution of slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurophysiol.*, 71:1174-1184.
- Olivera B.M., Miljanich G.P., Ramachandran J., Adams. M.E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release. The ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu. Rev Biochem.*, 63. 823 867.
- Ohno- Shosaku T., Kim I., Sawada S., Yamamoto C. (1996). Presence of the voltage-gated potassium channels sensitive to charybdotoxin in inhibitory presynaptic terminals of cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 207: 195-198
- Pacheco-Cano M.T., Bargas J., Hernández-López S., Tapia D., Galarraga E. (1996). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductances in neostriatal neurons. *Exp Brain Res.*, 110:205-211.

- Parent A., Hazrati L.N., (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.*, 20: 91-127.
- Parent A. (1990). Extrinsic connections of the basal ganglia. *TINS* 13: 254-258
- Pennartz C.M.A., Lopes da Silva F H (1994) Muscarinic modulation of synaptic transmission in slices of the rat ventral striatum is dependent on the frequency of afferent stimulation. *Brain Res.*, 645: 231-239.
- Perney T.M., Hirning, L.D., Leeman S.E., Miller R.J. (1986). Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6656-6659.
- Petrenko (1992). α -Latrotoxin receptor. Implication in nerve terminals function. *FEBS Lett.* 325:81-85.
- Pineda J.C., Galarraga G., Bargas J., Cristancho M., Aceves J. (1992). Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.*, 68:287-294.
- Pineda J.C., Bargas J., Flores-Hernández J., Galarraga E. (1995). Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *European J. Pharmacol.*, 281: 271-277.
- Prakriya M., Solaro C.R., Lingle C.J. (1996). $(Ca^{2+})_i$ elevations detected by BK channels during Ca^{2+} influx and muscarinic-mediated release of Ca^{2+} from intracellular stores in rat chromaffin cells. *J. Neurosci.*, 16: 4344-4359.
- Quirion R., Aubert I., Araujo D.M., Hersi A., Gaudreau P. (1993). Autoradiographic distribution of putative muscarinic receptor sub-types in mammalian brain. *Prog. Brain. Res.*, 98: 85-93.
- Re L., Cula V., Fulgenzi G., Marinelli F., Conetton C., Russini L. (1993). Muscarinic modulation of neurotransmission: The effects of some agonist and antagonists. *Gen Pharmacol.*, 24: 1447-1453.
- Reid C.A., Clements J.D., Bekkers J.M. (1997). Nonuniform distribution of Ca^{2+} channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *J Neurosci.*, 15: 2738-2745.
- Reisine, T. (1992). Molecular biology of neurotransmitter receptors. En *Discussions Neurosci.*, vol.4 Elsevier Publishers.
- Reuter H. (1995). Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca^{2+} -channel blockers. *Neuron* 14. 773-779.
- Reuter H. (1996). Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Current Op. Neurobiol.*, 6: 331-337.
- Reyes A., Galarraga E., Flores-Hernández J., Tapia D., Bargas J (1998). Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp. Brain Res.*, en prensa.
- Riederer P., Lange K.W., Youdin B.H. (1993) Recent advances in pharmacological therapy of Parkinson's disease. En *Adv. Neurol*, 60: 626-655.

- Ries V., Hertting G., Jackisch R. (1996). Properties of 3,4 diaminopyridine evoked dopamine and Ach release on rabbit caudate nucleus slices: involvement of facilitatory adenosine A₂ receptors or nitric oxide. *Brain Res.*, **743**: 303-314.
- Robitaille R., Charlton M.P. (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.*, **12**: 297-305.
- Roeper J., Pongs O. (1996). Presynaptic potassium channels. *Current Op. Neurobiol.*, **6**: 338-341.
- Rosahl T.W., Geppert M., Spillane D., Herz J., Hammer R.E., Malenka R.C., Südhof T.C. (1993). Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell*, **75**: 661-670
- Sanchez-Prieto J., Budd D.C., Herrero Y., Vázquez Nichols D.G. (1996). Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *TINS.*, **19**: 235-239.
- Santos A.E., Carvalho C.M., Macedo T.A., Carvalho A.P. (1995) Regulation of intracellular Ca²⁺ and GABA release by presynaptic GABAB receptors in rat cerebrocortical synaptosomes *Neurochem Int.*, **27**: 397-406.
- Scanziani M., Gähwiler B.H., Thompson S.M. (1995). Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarine and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca²⁺ channels involved? *Neuropharmacol.*, **34**: 1549-1557.
- Scharfman H.E. (1993). Presynaptic and postsynaptic action of somatostatin in area CA1 and dentate gyrus of rat and rabbit hippocampal slices. En: *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunviddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp: 42-70.
- Smith A.D., y Bolam J.P. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *TINS.*, **13**: 259-271
- Söllner T., Rothman J.E. (1994). Neurotransmission: Harnessing fusion machinery at the synapse. *TINS.*, **17**: 344-353.
- Somogyi P., Bolam J.P., Smith A.D. (1981). Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport degeneration procedure. *J. Comp. Neurol.*, **195**: 567-584
- Stanley E.F., Miroznic R.R. (1997). Cleavage of syntaxin prevent G-protein regulation of presynaptic calcium channels. *Nature*, **385**: 340-343
- Stefani A., Pisani A., Mercuri N.B., Bernardi G., Calabresi P. (1994). Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits calcium currents and GABA-mediated synaptic potentials in striatal neurons. **14**: 6734-6743.
- Stevens C.F., Wang Y. (1995). Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron* **14**: 795-802.
- Südhof T. (1995). The synaptic vesicle cycle. a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **361**: 645-653.

- Sugita S, Uchimura N., Jiang Z.G., North R.A. (1991). Distinct muscarinic receptors inhibit release of g-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2608-2611.
- Shupliakov O, Pieribone V A. Gad H, Brodin L. (1995). Synaptic vesicle depletion in reticulospinal axons is reduced by 5-hydroxytryptamine: direct evidence for presynaptic modulation of glutamatergic transmission. *Eur. J. Neurosci.*, **7**: 1111-1116.
- Swartz K.J., Merritt A., Bean B.P, Lovinger D.M. (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca²⁺ channels and synaptic transmission. *Nature* **361**: 165-168.
- Takahashi T, Forsythe I D., Tsujimoto T., Barnes-Davies M., Onodera K. (1996). Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* **274**: 594-597.
- Tank D.W, Regehr W G, Delaney K.R. (1995). A quantitative analysis of presynaptic calcium dynamics that contribute to short-term enhancement *J Neurosci.*, **15**. 7941-7952.
- Tarceilus E, Breer H. (1995). Presynaptic calcium channels: Pharmacology and regulation. *Neurochem. Int.*, **26**: 539-558.
- Thessleff S. (1980). Aminopyridinas and synaptic transmission. *Neurosci.*, **5**:1413-1419.
- Thessleff S., Molgo J., Lundh H. (1983). Botulinum toxin and 4-aminoquinoline induce similar abnormal type of spontaneous quantal transmitter release at the rat neuromuscular junction. *Brain Res.*, **264**: 89-97.
- Thomas P., Almers W. (1992). Exocytosis and its control at the synapse. *Curr. Opin Neurobiol.*, **2**: 308-311.
- Thompson S.M., Gähwiler B H. (1992). Comparison of the actions of baclofen at pre-and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro* *J. Physiol.*, **451**:329-345.
- Thompson A.M., Deuchars J., West D.C. (1993). Long, deep layer pyramid-pyramid single axon EPSPs in slices of rat motor cortex display paired-pulse and frequency-dependent depression mediated presynaptically, and self-facilitation mediated postsynaptically. *J. Neurophysiol.*, **70**: 2354-2369.
- Thompson S.M., Capogna M., Scanziani M. (1993b). Presynaptic inhibition in the hippocampus. *TINS*, **16**. 222-226.
- Tibbs G.R., Barric A.P., Van Mieghem F.J.E., McMahon H.T., Nicholls D G. (1989). Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: Effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release.
- Trifaró J-M., Vitale M.L. (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *TINS.*, **16**: 466-471
- Turner T.J, Adams M.E, Dunlap K (1992). Calcium channels coupled to glutamate release identified by w-Aga-IVA. *Science* **258** 310-313

- Turner T.J., Adams M.E., Dunlap K. (1993). Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 9518-9522.
- van den Pol A.N., Cao V., Belousov A.B. (1996). Dopamine enhancement and depression of glutamate-regulated calcium and electrical activity in hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.*, 76:3934-3948.
- Vannuchi M.G., Pepeu G. (1995). Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 190: 53-56.
- Verhage M., Ghijsen W.E.J.M., Lopes da Silva F.H. (1994). Presynaptic plasticity: The regulation of Ca²⁺-dependent transmitter release. *Prog. Neurobiol.*, 42: 539-574.
- Victor R.G., Thomas G.D., Marban E., O'Rourke B. (1995). Presynaptic modulation of cortical synaptic activity by calcineurin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:6269-6273
- Wheeler I.J., Wang X., Greenough W.T. (1994). Synapse-activated protein synthesis as a possible mechanism of plastic neural change. *Prog. Brain Res.*, 100: 189-194.
- Wheeler D.B., Randall A., Tsien R.W. (1996). Changes in action potential duration after reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus. *J. neurosci.*, 16: 2226-2237.
- Weisskopf M.G., Zalutsky R.A., Nicoll R.A. (1993). The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fiber synapses and modulates long-term potentiation. *Nature*, 363: 423-427.
- Weisskopf M.G., Castillo P.E., Zalutsky R.A., Nicoll R.A. (1994). Mediation of hippocampal Mossy fiber Long-Term Potentiation by Cyclic AMP. *Science* 265: 1878-1882.
- Westcrink B.H.C. 1995 *In vivo* evidence for presynaptic modulation of neurotransmitter release. *En Neurotransmitter release and its modulation*. David A. Powis y Stephen J. Bunn eds. Cambridge University Press. pp:217-232.
- Williams y Johnston, (1993). Muscarinic cholinergic inhibition of glutamatergic transmission. *En: Presynaptic receptors in the mammalian brain*. T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger Edit. Birkhäuser, Boston pp: 27-41.
- Wilson C.J. (1990). The basal ganglia.. *En: The synaptic organization of the brain*. Ed. Sheperd G.M. Oxford University Press: New York. pp:279-316.
- Wilson C.J. (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog. Brain Res.*, 99:277-297.
- Wilson C., Groves P.M. (1981). Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum *Brain Res.*, 220:67-80
- Wilson C.J., Kawaguchi T. (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.*, 16:2397-2410.

- Wu L. G., and Saggau P (1994). Presynaptic calcium is increase during synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J.Neurosci.*, **14**:645-654.
- Wu L.G., Saggau P. (1995). Block of multiple presynaptic calcium channel types by ω -Conotoxin-MVIIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses. *J. Neurophysiol.*, **73**: 1965-1972.
- Wu L.G , Saggau P (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *TINS.*, **20**: 204-212
- Yawo H., Chuhma N. (1994). ω -Conotoxin-sensitive and -resistant trasmitter release from the chick ciliry presynaptic terminal *J. Physiol.* **477**: 437-448.
- Young A B., Penney J.B. (1993) Biochemical and functional organization of the basal ganglia. En: *Parkinson's disease. Movement disorders.* J.Jankovic y E. Tolosa Eds. Segunda Edición. pp: 1-12.
- Zamponi G W., Bourinet E., Nelson D., Nargoot J., Snutch T P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by clacium channel alpha 1 subunit. *Nature*, **385**:6615,442-446.
- Zhang L , Weincr J.L., Carlen P.L. (1992) Muscarinic potentiation of IK in hippocampal Neurons: Electrophysiological Characterization of the signal Transduction pathway.
- Zimmermann H (1993). *Synaptic Transmission. Cellular and Molcular Basis.* Oxford University Press.
- Zoltay G., Cooper J.R. (1990) Ionic basis of inhibitory presynaptic modulatio in rat cortical synaptosomes. *J. Neurochem.*, **55**: 1008-1012
- Zoltay G., Cooper J.R. (1994). Presynaptic modulation by dopamine and GABA opens a potassium channel in rat cortical, striatal and hippocampal synaptosomes via cicosanoids. *Neurochem Int.*, **25**: 345-348.
- Zucker R.S. (1989). Short-term synaptic plasticity. *Ann. Rev Neurosci.* **12**: 13-31.

Brain Research Bulletin

Section Editor
Cellular and Molecular Neurobiology

Dr. Ian S. Zagon
Department of Neuroscience and Anatomy
M S. Hershey Medical Center
500 University Drive
Hershey, PA 17033, U.S.A.

TEL (717) 531-6409
FAX (717) 531-5003
E-MAIL isz1@psu.edu

November 15, 1997

Dr. Jose Bargas
Instituto de Fisologia Celular
UNAM
P.O. Box 70-253
04510 Mexico City DF, MEXICO

MS: BRB.ISZ.96-012

Title: Ca²⁺-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission

Dear Dr. Bargas:

I am delighted to inform you that the final version of your paper has been accepted by *Brain Research Bulletin*. The manuscript has been sent to the publisher and you will receive word from them as to proofs and reprints. The editors of *Brain Research Bulletin* have now introduced an online tracking service for manuscripts. The current status of your manuscript can be checked at any time on the World Wide Web page: <http://www.brc.cam.ac.uk/brb/status.htm>.

Thank you for selecting *Brain Research Bulletin* to publish your science. We look forward to receiving other manuscripts from your laboratory.

Sincerely,



Ian S. Zagon, Ph.D.
Section Editor

Ca²⁺-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission

José Bargas, Gabriela X. Ayala, Elizabeth Hernández, Elvira Galarraga

Depto. de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box: 70-253, 04510, México City

DF México

Running head: Neostriatal presynaptic Ca²⁺-channels

Correspondence: José Bargas. Instituto de Fisiología Celular UNAM, PO Box: 70-253, 04510, México City DF México. Tel.: (525) 622-5670. Fax: (525)622-5607.

e-mail: jbargas@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

Introduction

Different Ca^{2+} -channel types may contribute, with dissimilar efficacy, to transmitter release in different synapses. This has been found with the help of peptidic toxins highly specific for the different types of Ca^{2+} -channels [1, 7, 8, 17, 20, 21, 25, 30, 32]. In addition, a number of modulatory transmitters and pharmacological agents adjust transmission presynaptically by regulating Ca^{2+} -entry into the synaptic terminals [8, 23, 27, 31, 32]. Since presynaptic modulation might involve only some types of Ca^{2+} -channels [32], it is necessary to know the types of Ca^{2+} -channel involved in excitation-secretion coupling on a given class of synaptic terminals. However, there are a few reports on the actions of peptidic toxins on synaptic transmission in cerebral synapses [32].

For example, there are only two reports about the presynaptic Ca^{2+} -channels present in neostriatal glutamatergic afferents. Based on electrophysiological experiments the ω -conotoxin GVIA-sensitive (N-type) Ca^{2+} -channels (α 1B) were involved on glutamate release; finding little participation for the ω -agatoxin IVA-sensitive (P/Q-type) Ca^{2+} -channels (α 1A) [14]. However, work on neostriatal synaptosomes mainly involved the P/Q-type Ca^{2+} -channels on glutamate release [26]. Since this is a contradiction, we readdressed this issue in the present work. We found that the discrepancy may be due to the different experimental paradigms used to evaluate synaptic transmission [19] (in fact, when tested on the subthreshold EPSP the percentage of block obtained with ω -conotoxin GVIA and ω -agatoxin IVA is very similar to that found in other cerebral glutamatergic synapses [32]).

Methods

Neostriatal slices (400 μm thick) were obtained from Wistar rats (200-300 gm) and placed into artificial cerebrospinal solution at 25 °C for 1h. Recordings were done in a superfusion saline containing (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 and 11 glucose (290 mOsm/L with glucose, pH=7.4 after bubbling with 95% O_2 and 5% CO_2 , at 32-34

ABSTRACT: The actions of peptidic toxins that work as Ca^{2+} -channel antagonists were investigated on neostriatal glutamatergic transmission. Both intracellularly recorded excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) and extracellularly recorded population spikes (PS) evoked by afferent stimulation were evaluated in the presence of 5 μM bicuculline. Percentage of block (mean \pm sem, n=4) for these events (EPSP and PS, respectively) was: ω -AgTxIVA (100-200 nM): 35 \pm 2 and 54 \pm 4%; ω -CgTxGVIA (1 μM): 37 \pm 3 and 63 \pm 6%; ω -CgTxMVIC (500 nM): 40 \pm 4 and 50 \pm 2%, and calciseptine (500 nM): 5 \pm 4 and 9 \pm 6%. When given together, toxins had additive effects. The calciseptine effects were non-significant. The toxins were also tested on Ca^{2+} -dependent random synaptic responses induced by 100 μM 4-AP. Each toxin reduced the frequency of spontaneous EPSPs by more than 60% (n=2). The summed actions of individual toxins yields more than 100% block (superadditivity); suggesting that several terminals may possess more than one channel type. The reduction in frequency was not accompanied by a reduction in amplitude confirming that toxins' actions were presynaptic. It is concluded that at least three different Ca^{2+} -channel subtypes are involved in glutamate release in neostriatal afferents: N-type, P/Q-type and a type resistant to the toxins used. The L-type Ca^{2+} -channel had little, if any, participation.

KEY WORDS: Neostriatum, Ca^{2+} -channels, Synaptic transmission, Glutamate, Conotoxins.

Agatoxin

°C and superfusion set about 2 ml/min). Intracellular recordings were performed using standard techniques. Microelectrodes were filled with 3M K-acetate (80-120 M Ω) and records were obtained with an active bridge electrometer (Neurodata). Extracellular field potential recordings were obtained with microspikes filled with 0.5% NaCl (2-4 M Ω) and records were obtained with an AC amplifier. Intra- and extra-cellular recordings were digitized and saved on VHS tapes at 40 KHz to be analyzed off-line. Illustrations are the average of at least five records. Corpus callosum field stimulation was done with concentric bipolar electrodes. Stimulus were brief square voltage pulses (< 100 μ s, 0.2 Hz) delivered with a stimulator. Peptidic toxins were tested on population spikes (PS) of maximal or 1/2 maximal amplitudes (stimulus strength of about 6 and 20 V, respectively) [6] or on excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in the presence of 10 μ M bicuculline. Percentages reported are obtained after the amplitude of the signal reached a steady-state blockade during continuous toxin superfusion. Addition of the GABA_A antagonist, picrotoxin, did not make a significant change with present stimulation intensities and conditions [4-13, 22]. EPSPs were 1/3 or 1/2 of their threshold amplitude for action potential firing (10-15 mV at around -80 mV). Toxins were also tested on 4-AP induced spontaneous synaptic potentials [10].

CdCl₂, bicuculline, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), 4-aminopyridine (4-AP), (S)-igma, ω -Conoloxin GVIA (ω -CgTxGVIA), ω -Conotoxin MVIIC (ω -CgTxMVIIC), ω -Agatoxin IVA (ω -AgTxIVA), calciseptine (Pepidas International), and nocardipine (Atomone), were all added from freshly prepared stock solutions to the bath saline.

Results

The neostriatal PS has been described. It contains an initial short-latency, TTX- and picrotoxin-sensitive N₁ component which is antidromic, and a second N₂ component sensitive to ω -extracellular Ca²⁺ and glutamate receptor antagonists; which is orthodromic [6, 16, 17, 24, 33]. Experiments on Figure 1 corroborate and extend these previous results. First, a reversible

block of the N₂ component was induced with low extracellular Ca²⁺ and high extracellular Mg²⁺ (n=8) (Fig. 1A). Second, Figure 1B shows that a GABAergic component is present during orthodromic stimulation since the addition of bicuculline (5-10 μ M, n=8) induces repetitive discharge. Hence, all other experiments were done in the presence of bicuculline (10 μ M) to work only with the glutamatergic component. Third, N₁ and N₂ components of PS closely reflect intracellularly recorded antidromic and orthodromic responses shown at bottom [11] (Fig. 1C). Fourth, 50 μ M Cd²⁺ reversibly blocked the N₂ response without affecting N₁ (Fig. 1D). And lastly, Figure 1E shows that 10 μ M CNQX, the selective AMPA receptor antagonist, reversibly blocked the N₂ response without affecting N₁ (n=10). These experiments show the identification of the synaptically driven N₂ component of the neostriatal PS.

Peptidic toxins at concentrations that are known to block different types of high voltage activated (HVA) Ca²⁺-channels in a highly specific manner [1, 7, 8, 15, 17, 25, 28, 32] were tested upon both the intracellularly recorded EPSP (Fig. 2, top records in each row), and the extracellularly recorded PS of half maximal amplitude (Fig. 2, bottom records in each row). Figure 2 shows that ω -AgTxIVA (100-200 nM), ω -CgTxGVIA (1 μ M), and ω -CgTxMVIIC (500 nM) all reduced both responses significantly (at least P < 0.02 in each case with Student's T, n=4). Effects of calciseptine (500 nM) were non-significant. Each toxin reduced the intracellular EPSP and the extracellular PS, respectively, by (mean \pm sem) ω -AgTxIVA, 35 \pm 2 and 54 \pm 4%, ω -CgTxGVIA, 37 \pm 3 and 63 \pm 6%, ω -CgTxMVIIC, 40 \pm 4 and 50 \pm 2%, and calciseptine, 5 \pm 4 and 9 \pm 6%. As previously reported [14], dihydropyridines had no effect on these potentials (5 μ M nocardipine not illustrated). The block on the subthreshold EPSP was consistently less than the block on the PS. These experiments show that various Ca²⁺-channel types may be involved on transmitter release at these terminals.

When added one after the other, the toxins had additive effects, e.g., ω -AgTxIVA plus ω -CgTxGVIA blocked 80 \pm 8 % of PS amplitude (cf. with < 60% block with each toxin given alone, see above, n=2) (not shown). In spite of these additive effects, a complete block was

never seen with any combination of toxins given together. This is noticeable since these are saturating concentrations [1, 7, 8, 15, 23, 25, 26, 28, 32] and addition of the blockade produced by each individual toxin should account for more than 100% block (superadditivity)

When tested on PS responses of maximal amplitude, the magnitude of the block was

reduced e.g. 200 nM ω -AgTxIVA only blocked about 15% of PS amplitude (n=2), whereas 1.1 μ M ω -CgTxGVIA blocked about 24% (n=2) and ω -CgTxMVIIC blocked about 30% [29]

Individual toxins were also tested on Ca^{2+} -dependent random synaptic responses

induced by 100 nM 4-AP [10]. With this paradigm, all toxins, except calicteptine, reduced the frequency of these events by more than 60% (Fig. 3, n=2 in each case), with no significant changes in the amplitude distributions of the synaptic events (e.g., Fig. 3D).

Discussion

The present experiments show that, as in other glutamatergic synapses of the CNS, N_1 , P/Q, and "resistant" (Non-LNPO) types of Ca^{2+} -channels cooperate to elicit glutamate release in neostriatal afferents [1, 8, 15, 19, 20, 21, 25, 28, 29, 32]. Differences in the percentage of toxin block were found depending on the experimental paradigm [19], which may explain previous differences reported at this synapse [14, 26]

The synaptic nature of the N_1 -component of the PS was further substantiated: a) This component could be blocked by micromolar Cd^{2+} , suggesting that all Ca^{2+} -channel types involved in its generation are of the HVA class. b) The N_1 potential contains a substantial contribution from GABAergic transmission, as it has been shown for the intracellular EPSP [11, 12, 13, 22]. And c) The N_1 potential could be blocked by CNQX, i.e., it is produced by AMPA receptors activation, as shown for the EPSP [5, 11, 13]. It is concluded that results from EPSPs recorded from individual cells can be substantiated with results obtained with field recordings from Ca^{2+} populations [32]

Toxin's actions were presynaptic because: a) No postsynaptic Ca^{2+} -conductance, in these cells, is active at the resting membrane potential in which the EPSP was evaluated [2], and no change in postsynaptic input resistance was detected during toxin's actions. b) Toxins reduced the N_1 , but not the N_2 -component, and c) When tested on 4-AP-induced EPSPs, the toxins reduced the frequency of their appearance without changing their amplitude distribution [3, 19]. Finally, the L-type Ca^{2+} -channel antagonist, calicteptine, as well as nicardipine, had no significant effects with any paradigm, confirming previous reports [1, 8, 14, 26, 29]

Three toxins blocked transmission: ω -AgTxIVA, ω -CgTxGVIA and ω -CgTxMVIIC. At the concentrations used, ω -AgTxIVA block is specific for P/Q type of Ca^{2+} -channels and ω -CgTxGVIA is specific for N type of Ca^{2+} -channels. The concentrations used were saturating [1, 7, 8, 15, 17, 25, 26, 28, 30-32]. ω -CgTxMVIIC is less specific, at the concentrations used it may block both P/Q and N type of Ca^{2+} -channels although these concentrations may not be saturating for N channels [7, 17]. The largest effect was obtained looking at Ca^{2+} -dependent 4-AP-induced release: there was a reduction of more than 60% of events' frequency by each of the three toxins. This is in contrast with the amplitude block obtained with subthreshold EPSPs: the maximum block with a single toxin was about 40% [9, 20, 23, 29]. The percentage of block for the PS (1/2 maximal amplitude) was between 50 and 63%. Thus, superadditivity could only be achieved by any two toxins in the case of 4-AP-induced release [20]. This can be explained if a significant number of terminals possess more than one type of Ca^{2+} -channels, so that the release probability of a terminal will be reduced even if not all its channels are blocked (cooperativity) [20]. This will be manifest when looking at release from randomly excited terminals [10]. However, no combination of toxins blocked completely any of the evoked events: PS or EPSP (maximum block with two or three toxins given together was between 70 and 95%) [14]. This is expected if the terminals possess a Ca^{2+} -channel resistant to all toxins used (Non-LNPO) [32]

The blockade obtained with the subline-tetrad EPSP's was very similar to that obtained in other glutamatergic synapses of the mammalian brain [15, 28 *cf.* ref. 32, Tab. 1]. The larger blockade obtained with the neonatal PS response may be explained because it includes a component from all-or-nothing action potentials. This component may amplify toxins' actions. However, if this is true, it is important to note that transmission that evokes action potential firing is the physiological important event for neuron to neuron communication. Thus, transmission block affecting a single channel type may have a much greater impact (v.g., in behavior) than that expected from the reduction of transmitter release. This conclusion has important consequences when evaluating *in vivo*, the actions of presynaptic neuromodulatory transmitters.

Lastly, the action of the toxins was reduced if the PSs were of maximal amplitude. This reduction was larger for ω -AgTxIVA. Thus, the balance between N_r and P/Q-type channels in these afferents may be different than that found in other synapses [14, 20, 29].

DISCUSSION

This work was supported by DGAPA-UNAM grant IN201194 and CONACYT (México) grant O115P-N to JB. We thank the technical assistance of M.C. Vichis.

REFERENCES

- 1 Avery R R Johnston D. Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 16: 5587-5582, 1996.
- 2 Bergas J Howe A Ebenne J ,Cao, Y, Surmeier, D.J Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci.* 14: 6687-6696, 1994
- 3 Capogna M, Gähwiler, B.H., Thompson, S.M. Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with picrotoxin, gadolinium, and α -latrotoxin in the hippocampus. *J Neurophysiol.* 75: 2017-2028, 1996
- 4 Cepeda C, Walsh, J.P., Peacock, W., Buchwald, N.A, Levine, M.S Neurophysiological, pharmacological and morphological properties of human caudate neurons recorded in vitro. *Neuroscience* 59: 89-103, 1994
- 5 Chenobni, E., Herrling, P.L., Lanfumej, L., Stanzione, P. Excitatory aminoacids in synaptic excitation of rat striatal neurons in vitro. *J. Physiol (Lond)* 400: 677-690, 1988
- 6 Cordingly, G.E., Weight, F.F Non-cholinergic synaptic excitation in neostriatum. Pharmacological evidence for mediation by a glutamate-like transmitter. *Br. J. Pharmacol.* 88: 847-858, 1986
- 7 De Waard M, Gurnett C. A., Campbell, K.P. Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. In: T. Narahashi, ed. *on Channels 4*. New York: Plenum Press: 1996: 41-87
- 8 De Waele JR, Schweitz H, Maes P, Tarter A and Lazdunski M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2437-2440, 1991
- 9 Dittman J S, Regehr W G. Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* 16: 1623-1633, 1996
- 10 Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Pineda, J.C., Bergas, J. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J Neurophysiol* 72: 2246-2256, 1994
- 11 Jiang, Z.G North, R.A. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J Physiol (Lond)* 443: 533-553, 1991
- 12 Kita T, Kita, H., Kita, S.T. Local stimulation induced GABAergic responses in rat striatal slice preparation. Intracellular recordings on QX-314 injected neurons. *Brain Res.* 360: 304-310, 1985
13. Levine, M.S.; Li, Z.; Cepada, C.; Cromwell, H.C.; Allemus, K.L. Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse* 24: 65-78; 1996
- 14 Lovinger, D.M., Mermitt, A., and Reyes, D. Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neuroscience* 82: 31-40; 1994
15. Luebke, J.I.; Dunlap, K., and Turner, T.J. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11: 895-902, 1993
- 16 Malenka, R.C., Kocsis, J.D. Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neurosci.* 8: 3750-3758, 1988
- 17 Miljanich, G.P., Ramachandran, J. Antagonists of neuronal calcium channels, structure, function and therapeutic implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 707-734, 1995
18. Misgeld, U., Okada, Y., Hassler, R. Locally evoked potentials in slices of rat neostriatum: A tool for the investigation of intrinsic excitatory processes. *Exp. Brain Res.* 34: 575-580, 1979
- 19 Momyama, A., Takahashi, T. Calcium channels responsible for potassium-induced transmitter release at rat cerebellar synapses. *J Physiol (Lond)* 476: 197-202, 1994
- 20 Reid C.A., Clements, J.D., Bekkers, J.M. Nonuniform distribution of Ca²⁺ channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 17: 2738-2745, 1997
- 21 Reuter, H. Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca²⁺ channel blockers. *Neuron* 14: 773-779; 1995

- 22 Seabrook G R, Howson W, Lacey M G Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABA_A receptors on neurons in brain slices Br J Pharmacol 101 949-958, 1990
- 23 Schnitz K P, Miller R J Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses depends on and role of presynaptic Ca²⁺ channels. J Neurophysiol 76 39-46 1996
- 24 Tagawa M, Yamamoto C Suppressing action of cholinergic agents on synaptic transmission in the corpus striatum of rats. Exp Neurol 62: 433-443 1978
- 25 Taylor E, Breer H Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation Neurochem Int 26 539-558, 1995
- 26 Turner T J, Adams M E, Dunlap K Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. PNAS USA 90: 9518-9522, 1993
- 27 Wang S.-J, Huang C.-C, Hsu K.-S., Tsai J.-J., Gean, P.-W. Presynaptic inhibition of excitatory neurotransmission by lamotrigine in the rat amygdalar neurons. Synapse 24: 249-255 1995
- 28 Wheeler D B, Randall A., Tsien R.W. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science 264 107-111, 1994
- 29 Wheeler D B, Randall A., Tsien R.W. Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus. J Neurosci 15 2226-2237 1995
- 30 Wu L G, Saggau P Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3 to CA1 synapses of the hippocampus. J Neurosci 14: 5613-5622 1994
- 31 Wu L G, Saggau P GABA_A receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. J Physiol (Lond) 485 643-657 1995
- 32 Wu L G, Saggau P Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. THNS 20 204-212 1997

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Identification of synaptic components in the extracellular field potential. A. N_1 component is blocked by low extracellular Ca^{2+} and high extracellular Mg^{2+} . B. Synaptic component contains GABAergic activation since bicuculline induces repetitive firing. C. Match of extracellular PS (top) and intracellular recordings (bottom). D. Cd^{2+} reduces the N_1 component. E. The selective AMPA antagonist, CNQX, greatly reduces the N_1 component. Stimulus strength for half maximal amplitude was used in all traces except for B (80% of maximal amplitude). Stimulus artifacts were suppressed. Leftmost traces were taken in control saline and middle traces show the effects of superfused substances. Rightmost traces in A, D and E illustrate partial washing of the effects. Horizontal bars are 5 ms. Voltage calibration in A, D and E is valid for D and E.

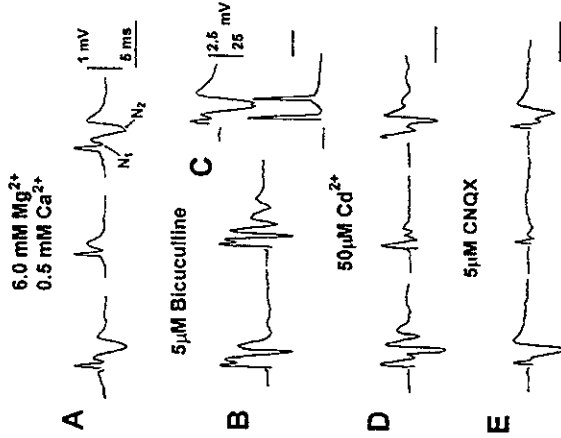
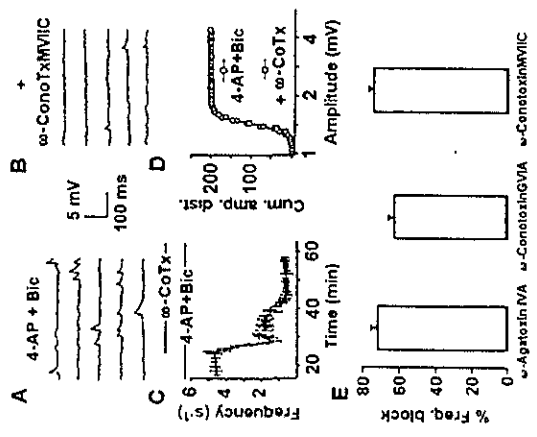
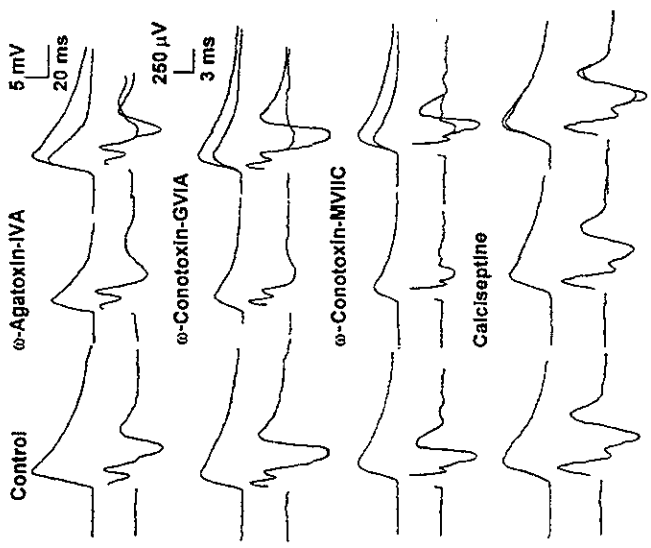


Figure 2 Sensitivity of synaptic component to toxins which are Ca^{2+} -channel antagonists. Each row illustrates subthreshold EPSPs at top and PSs at bottom. Leftmost traces are the controls. Middle traces show toxins' effects in both events. Rightmost traces show superimposition of control and test traces. Stimulus artifacts were suppressed.

Figure 3 Effects of Ca^{2+} -channel toxins on 4-AP-induced release. A. Samples of random synaptic events recorded during 100 μ M 4-AP. B. Sample recordings taken during 500nM ω -CgTx/MV1C. C. Time course for the effect of ω -CgTx/MV1C on the frequency of 4-AP induced events (4-AP and bicuculline -Bic- were also present). D. Cumulative amplitude distributions of synaptic events before and during ω -CgTx/MV1C. E. A similar reduction in frequency (C) \geq 60% without a reduction of mean amplitude (D), was seen for all three toxins: ω -AgTx/IVA, ω -CgTx/GVIA and ω -CgTx/MV1C.



**3- α -CHLORO-IMPERIALINE, A POTENT BLOCKER OF CHOLINERGIC
PRESYNAPTIC MODULATION OF GLUTAMATERGIC AFFERENTS IN
THE RAT NEOSTRIATUM**

*Elizabeth Hernández-Echeagaray, Elvira Galarraga and José Bargas**

Dept de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México City D.F. 04510, México.

*Correspondence: José Bargas Instituto de Fisiología Celular, UNAM. PO Box: 70-253.

México City D.F. 04510 México Tel.: (525) 622-5670. Fax: (525) 622-5607.

e-mail: jbargas@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

Running Title. muscarinic presynaptic modulation

Introduction

Neostriatal activity is commanded by glutamatergic afferents coming from the cerebral cortex and thalamus (Cherubini et al., 1988, Jiang and North, 1991, Wilson, 1990, 1996, Alexander, 1995). Although fast ligand-gated synaptic transmission from cortex is the main driver of medium spiny neurons (MSNs), the activity of these neurons is also modulated by transmitters linked to G-protein signaling systems. For instance, acetylcholine, acting through postsynaptic muscarinic receptors (Dodi and Misgeld, 1986, Pineda et al., 1995) in addition, various evidence supports the existence of presynaptic muscarinic modulation of glutamatergic afferents (Dodi and Misgeld, 1986, Malenka and Kocsis, 1988, Calabresi et al., 1993, Hsu et al., 1995). Thus, an apparently heterogeneous population of muscarinic receptors may modulate synaptic transmission at pre- and post-synaptic levels in the neostriatum (Hersch and Levey, 1995). It is then necessary to clarify which neurons and synapses express each receptor subtype. This work investigated the subtypes of muscarinic receptor involved in pre-synaptic inhibition. There is a therapeutic potential of muscarinic agents on motor and basal ganglia related disorders (McGeer and McGeer, 1983). Accordingly, the ability of various muscarinic antagonists to block presynaptic inhibition induced by muscarine was evaluated with the aid of the PPF paradigm (Dunwiddie & Haas., 1985, Baskys & Malenka, 1991, Kahle & Cotman., 1993, Wu & Saggau, 1994, Dobanne et al., 1996). A part of this work has been presented in abstract form (Hernández et al., 1996)

Methods

Brain Slices

Anaesthetized adult Wistar rats (~2 mo) were decapitated and their brains rapidly dissected and cut sagittally (400 µm) in a vibratome. Dorsal neostriatal slices separated from cortex were then kept in a 95% O₂ and 5% CO₂ saturated bathing solution containing (in mM): 125 NaCl,

Summary

Cortico-thalamic glutamatergic afferents command neuronal activity in the neostriatum. Cholinergic interneurons modulate medium spiny neurons activity by both pre- and postsynaptic actions through the activation of muscarinic receptors. The muscarinic presynaptic modulation was analyzed electrophysiologically. The transmitter release induced by 4-AP was studied and the block of paired pulse facilitation (PPF) by different muscarinic receptor antagonists was analyzed. The GABA_A antagonist bicuculline isolated glutamatergic transmission. Muscarinic agonists decreased the frequency of random synaptic potentials induced by 4-AP in about 60% of the cases without changes in input resistance (R_{in}) of the postsynaptic neuron or in the mean amplitude of the synaptic events, indicating a presynaptic action. Both 1 µM carbachol and 20 nM muscarine increased PPF. Muscarinic receptor antagonists blocked this action with a potency order: 5- α -chloroimipramine > 4-DAMP > AFDX-116 > galamine >> pirenzepine. The EC₅₀s for the first three antagonists were (µM): 0.65, 1.1 and 3.0. Their respective Hill coefficients were 1.9, 1.4, and 1.3. 3- α -chloroimipramine reduced the PPF almost completely. The M₁ and the M₂ muscarinic receptor antagonists 4-DAMP and AFDX-116 consistently blocked about half the PPF. These data is consistent with the existence of both M₁ and M₂ muscarinic receptors in striatal glutamatergic afferents.

Key words: Acetylcholine, neostriatum, presynaptic modulation, muscarinic receptors,

5- α -chloroimipramine, galamine

screen. Control and experimental conditions were tested in the same cells. Only one cell per slice was recorded.

Paired Pulse Facilitation

Paired pulse facilitation (PPF) was used to identify the muscarinic receptor type more likely involved in the cholinergic presynaptic inhibition of striatal glutamatergic afferents. PPF is a good indicator of presynaptic inhibition and it has been widely used, discussed in detail and characterized by others (Dunwiddie & Haas, 1985; Baskys & Malenka, 1991; Kahle & Colman, 1993; Wu & Saggau, 1994; Dabonne et al., 1996). Briefly, two subthreshold (about 1/2 threshold) stimuli were applied through a bipolar stimulating electrode placed in the corpus callosum at about 1-2 mm from the recording electrode located in the caudate head. These stimuli evoked a pair of synaptic responses (EPSPs, see below). The chosen interstimulus interval was 25-100 milliseconds. The stimulus strength was adjusted to induce various degrees of PPF under control conditions. Once defined, the stimulus strength was not

changed during the course of the experiments. PPF was expressed as the percent increase of the second synaptic response relative to the first. Note that if an EPSP reduction were due to a postsynaptic mechanism, both EPSPs in the pair should be reduced to the same extent. Bicuculline was added to the bathing medium to eliminate the inhibitory component of the synaptic response (e.g., Nisenbaum and Berger, 1992). Since CNQX plus APV and bicuculline added to the bath completely block all evoked synaptic activity, it is concluded that no other source of fast ligand-gated synaptic transmission impinge upon medium spiny neostriatal output neurons (Jiang and North, 1991; Lovinger et al., 1993). Complete current-voltage relationships were done in most cells to ensure that postsynaptic membrane properties do not change during PPF induction (Fig. 3). Furthermore, in all cells, including the few ones in which

3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃, and 10 glucose (298mOsm/L) with glucose and pH 7.4 in H₂O. After 1 h incubation, the slices were delivered to a recording chamber at 32-34 °C. The superfusion rate was 1-2 ml/min.

Intracellular recordings

Intracellular recordings were carried out using glass micropipettes (80-120 M Ω) filled with 1M potassium acetate (Sigma, St. Louis) and 3M potassium acetate. Recordings were obtained with a high input impedance electrometer (Neurodata, Instruments Corp.) with an active bridge circuit using standard techniques. Cell membrane potential and resistance, as well as synaptic frequency were recorded near the resting membrane potential, about -80 mV (Flores-Hernández et al., 1994). Recordings were digitized, captured on VHS tapes, and analyzed offline with the aid of a digital oscilloscope and software designed in the laboratory in the Laboratory environment (National Ins., Texas).

4-AP induced release

Transmitter release was induced by 100 μ M 4-aminopyridine (4-AP) in the presence of 10 μ M bicuculline to increase the probability of occurrence of spontaneous excitatory synaptic potentials (EPSPs) of near unitary amplitude (Flores-Hernández et al., 1994, 1997). This procedure did not change post-synaptic membrane properties. EPSPs induced in this way are completely blocked by a solution containing 10 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) plus 50 μ M 2-amino-phosphonolvalic acid (APV) (see below). After reaching a steady-state frequency (20 minutes), drugs were applied to the bath. EPSPs were counted with a home-made window discriminator that first differentiated the records (see Flores-Hernández et al., 1997). Frequency vs time plots were done by obtaining the frequency of events per second (s⁻¹) and then averaging these measurements per minute. Cumulative amplitude distributions were done by directly measuring individual EPSPs in the oscilloscope

dissolved in 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO) and used the same day. Both 4-DAMP and control superfusion solutions had the same DMSO concentration.

Cell labeling

After recording some of the neurons were injected with biocytin according to the protocol described by Honkawa and Armstrong (1988). Briefly, slices were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and 1% picric acid in phosphate buffer (0.1M, pH 7.4). Slices were then cryoprotected in 30% sucrose overnight, and vibratome sectioned at 60 μ m. Sections were incubated for 2-4 hours at room temperature in phosphate buffer containing 0.2% Triton X-100, avidin and biotinylated horseradish peroxidase (ABC-HRP, Vector Labs, CA). Peroxidase activity was revealed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. Stained cells were drawn using consecutive sections and reconstructed with the aid of a camera lucida.

Statistical Analysis

Statistical analysis of frequency and EPSP amplitudes was performed using Mann-Whitney U tests. Only complete experiments were used for statistical analysis.

Results

Glutamate release induced by 4-AP

Adult neocortical cells show a low frequency of spontaneous synaptic potentials (SSPs). However, SSPs frequency increases in the presence of 4-AP. The addition of bicuculline leaves SSPs that can be blocked by CNQX and APV showing that they indeed reflect glutamate release (Flores-Hernández et al., 1994, 1997).

Figure 1 shows that the frequency of 4-AP-induced glutamatergic SSPs was reduced by the muscarinic agonist carbachol (1 μ M). The mean frequency is reduced from about 2.16 \pm 0.32 s⁻¹ to about 1.31 \pm 0.28 s⁻¹ in 8 out of 14 spiny neurons ($p < 0.03$, Fig. 1B). In 40% of

current-voltage relationships were not possible to obtain, a current step was given during the whole experiment to monitor input resistance.

Concentration-response relationships were obtained by measuring the percentage of PPF blockage achieved by increasing concentrations of the muscarinic receptor antagonists (see Fig. 7). These curves reflected the ability of a given receptor blocker to antagonize the PPF induced by 20 nM muscarine. Concentration-response plots were obtained using several animals and brain slices, and at least 4 experiments were done for each antagonist concentration in ≥ 20 experiments for each concentration-response curve. Mean \pm s.e.m. are depicted in each graph panel. Parameters are reported as the best fitted estimate \pm the standard estimation error. Concentration-response curves were fitted with a non-linear Marquardt algorithm (Sigma Plot, Jandel) to the following equation

$$E/E_{MAX} = 1/(1 + (EC_{50}/[ant])^n)$$

where E is the percent of PPF block induced by the antagonist, E_{MAX} is the maximal blocking effect (100%), EC_{50} is the concentration inducing a 50% block, [ant] is the antagonist concentration, and n = an approximation to the Hill coefficient.

Drugs

M₁ (flunitrazepam), M₂ (galamine, 3- α -chloro imipenamine, AFDX-116) and M₃ (4-(2-hydroxyethoxy)-N-[2-(2-hydroxyethyl)propyl]piperidine or 4-DAMP, irreversible mustard) (RBI, Nauck MA), very selective muscarinic antagonists, were tested against the PPF produced by 1 μ M carbachol or 20 nM muscarine. CNQX, APV (RBI), 4-AP, bicuculline, carbachol, muscarine, atropine (Sigma, St. Louis) and AFDX 116 (a gift from Karl Thomae, GmbH, Germany), were also dissolved from freshly prepared stock solutions into the superfusion saline. 4-DAMP was

2) but reduced the PPF elicited in control conditions. Bottom row in Figure 5 illustrates the effect of washing the antagonists leaving muscarine in the bathing solution. Without the antagonist, muscarine was able to induce a larger PPF than that seen in the control. Also note that EPSPs amplitude becomes smaller. Time constants of EPSP decay in the presence of muscarine did not change significantly with respect to the time constants in the presence of muscarine plus the antagonist. These Results reinforce this effect to be presynaptic. The effects of the muscarinic M_2 receptor antagonists were concentration dependent (see Fig. 7). These experiments demonstrated that muscarinic M_2 receptors participate in the presynaptic modulation of glutamatergic afferents to the neostriatum.

Hereafter, previous results using the reversible antagonist 4-DAMP, which is not very selective, have suggested that muscarinic M_2 receptors may also be involved in presynaptic modulation (Hsu et al., 1995). Therefore, we decided to test the irreversible antagonist 4-DAMP, reported as very selective for muscarinic M_2 receptors (Barlow et al., 1991). Figure 5 shows that 10 nM 4-DAMP blocks the PPF induced by 20 nM muscarine. In this case, the time constant of decay or input resistance did not change. The effect of this muscarinic M_2 receptor antagonist was also concentration-dependent (see Fig. 7). This Result suggests that muscarinic M_2 receptors are also present on neostriatal glutamatergic afferents.

Concentration-response curves for the most potent muscarinic receptor antagonists were built to compare their effects. They are depicted in Fig. 7 (see Methods). The order of potency was 3- α -chlorompenaline > 4-DAMP > AFDX-116 > gallamine >> pirenzepine. The EC₅₀ for PPF block of the most potent drugs were (estimate \pm standard estimation error): 0.65 \pm 0.13 nM, 1.1 \pm 0.46 nM and 3.0 \pm 0.3 nM for 3- α -chlorompenaline, 4-DAMP and AFDX-116, respectively. These coefficients were significantly different (at least $p < 0.05$ between any two values). Therefore, AFDX-116 nor 4-DAMP could completely block the PPF at saturating

concentrations. 72 \pm 3.8 and 68 \pm 2.7%, respectively ($p = NS$). Only 3- α -chlorompenaline was able to induce an almost complete block of PPF at saturating concentrations 97 \pm 2.7% ($p < 0.001$). The approximation to their Hill coefficients were 1.9 \pm 0.09, 1.4 \pm 0.05 and 1.3 \pm 0.09 for 3- α -chlorompenaline, 4-DAMP and AFDX-116, respectively.

Discussion

These experiments show that muscarine, at nanomolar concentrations, potently induces PPF and therefore presynaptic inhibition of glutamatergic neostriatal afferents. Muscarine's (and carbachol's) effects are blocked by atropine and by very selective muscarinic M_1 and M_2 receptor antagonists, but not by the muscarinic M_3 preferring antagonist, pirenzepine. Among the effective antagonists, 3- α -chlorompenaline turned out to be the most potent 4-AP-induced release.

Previous work has demonstrated that 4-AP induces random transmitter release (Theisler 1980, Kita et al., 1985, Flores-Hernández et al., 1994). In the presence of bicuculline, the random EPSPs recorded in the neostriatum are glutamatergic and most probably come from cortical afferents. This glutamate release is TTX-sensitive and Ca²⁺-dependent (Flores-Hernández et al., 1994). In a minority of cases, this release may be modulated by dopaminergic D₂ receptor agonist at high concentrations (Flores-Hernández et al., 1997). The present work shows, in contrast, that a greater amount of glutamatergic afferents are modulated by muscarinic receptor activation. This modulation is inhibitory in nature and presynaptic in function since EPSPs frequency decreased without a change in the mean amplitude of the synaptic event. Negative experiments indicate that the agonist did not change EPSP frequency, suggest that not all glutamatergic afferents possess muscarinic receptors.

The postsynaptic actions of muscarinic agonists occur at larger concentrations. In particular, micromolar concentrations of muscarine are needed to attain changes in the

antagonists (Barlow et al., 1991; Baumgold et al., 1994). 3- α -chloroimprenaline and 4-DAMP. However, AFDX-116 and 4-DAMP blocked muscarine-induced PPF incompletely (see Results). In contrast, 3- α -chloroimprenaline blocked muscarinic effects on PPF by nearly 100%, being the most efficient drug. Moreover, since Hill coefficients are greater than one, it is likely that more than one muscarinic receptor type, i.e., M_2 and M_3 , participate in the cholinergic presynaptic modulation of neostriatal glutamatergic afferents. Nevertheless, the very selective M_2 and M_3 antagonists, AFDX-116 (M_2) and 4-DAMP (M_3) had Hill coefficients approaching unity, whereas the most efficient drug, 3- α -chloroimprenaline, had a Hill coefficient far from unity, suggesting cooperativity. In addition, preliminary experiments suggest an additive, but complex interaction between M_2 and M_3 receptor agonists (Bargas and Galarraga, unpublished). Taken together, these data lead to the conclusion that 3- α -chloroimprenaline is not only acting on striatal muscarinic M_2 receptors but also on muscarinic M_3 receptors. This would explain its greater blocking efficiency. On the other hand, AFDX-116 and 4-DAMP had very similar EC_{50} 's. Moreover, a probably more specific M_2 receptor antagonist, as AFDX-384 (untested), may possess a smaller EC_{50} than that found for AFDX-116. Thus, both M_2 and M_3 presynaptic receptors need very similar concentrations for activation. The most parsimonious interpretation for these experimental results is that some afferent terminals possess muscarinic M_2 receptors while other terminals possess M_3 receptors. Only 3- α -chloroimprenaline might act on both. Although further experiments are needed to better evaluate this possibility, a supporting set of data states that m_2 and m_3 receptor clones have been found in aspiry interneurons and in both symmetrical and asymmetrical contacts (Hersch and Levey, 1995). In addition, muscarinic M_2 and M_3 receptors induce presynaptic modulation in other brain nuclei (e.g., Dutar y Nicoll, 1988).

subthreshold input resistance or firing behavior. Moreover, these changes can be attributed to muscarinic M_2 receptors, precisely the receptors not implicated in presynaptic inhibition (Pineda et al., 1995). This correlates with the fact that m_2 and m_3 receptor clones have been found in medium spiny neurons (Hersch and Levey, 1995).

Paired-pulse facilitation (PPF)

Paired pulse facilitation has been widely used to demonstrate presynaptic inhibition and modulation (Dunwiddie and Has, 1985; Kahle and Colman, 1993; Andreasen and Hablitz, 1994; Wu and Saggau, 1994; Flindewisch and Guinck, 1995; Kobayashi et al., 1995; Debanne et al., 1995). Here it was used to identify the muscarinic receptor types mediating the cholinergic modulation of glutamate release in the neostriatum. Our results demonstrated that muscarinic agonists increase PPF without a change in postsynaptic input resistance, membrane potential, firing threshold or membrane properties. The muscarinic effect on PPF was blocked by atropine and by muscarinic M_2 and M_3 receptor antagonists. These Results, together with previous work (Dodi and Misgeld, 1986; Malenka and Kocsis, 1988; Calabresi et al., 1993; Hsu et al., 1995), support the notion that acetylcholine presynaptically inhibits glutamatergic afferents in the neostriatum.

The participation of muscarinic M_2 and M_3 cholinergic receptors in the modulation of glutamate release in the neostriatum was documented. Pirenzepine, a selective muscarinic M_1 receptor antagonist was without action. The order of potency for the effective antagonism was 3- α -chloroimprenaline > 4-DAMP > AFDX-116 > gallamine >> pirenzepine. The EC_{50} 's for the three most effective drugs were: 0.65 nM, 1.0 nM and 3.0 nM (see Results). Thus, muscarinic M_2 and M_3 receptor antagonists blocked PPF at nanomolar concentrations (see also the concentration-response plot for the highly specific M_3 receptor antagonist, 4-DAMP (irreversible mustard) appeared in between the curves of two reputed M_2 receptor

References

- Alexander G E (1995) Basal Ganglia. In *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks* (Arbib M A, Ed) pp 139-144. The MIT Press, Cambridge MA
- Andreassen M S and Hablitz J J (1994) Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus. A patch-clamp study in rat hippocampus *in vitro*. *J Neurosci*. **72**: 326-336
- Barlow R B, McMillen L S, Veale M A (1991) The use of 4-diphenylacetoxy-N-(2-chloroethyl)-piperidine (4-DAMP) for estimating the apparent affinities of some agonists acting at muscarinic receptors in guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol*. **102**: 657-662
- Baskys A and Malenka R C (1991) Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol Lond*. **444**: 667-701
- Baumgold J, Pzybyc R L, and Reba R C (1994) 3- α -Chloromphenaline an M₂-selective muscarinic receptor antagonist that penetrates into brain. *Eur J Pharmacol*. **251**: 315-317
- Calabresi P, Marcun N B and Bernardi, G (1993) Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog Brain Res*. **99**: 295-308
- Cherubini E, Herfing P L, Lanfumei L and Stanzione P (1998) Excitatory aminoacids in synaptic excitation of rat striatal neurones *in vitro*. *J Physiol Lond*. **400**: 677-690
- Debanne D, Guémeau N C, Gähwiler B H and Thompson S M (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol Lond*. **491**: 163-176
- Dodt H U and Misgeld U (1986) Muscarinic slow excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum. *J Physiol Lond*. **380**: 593-608
- Dunwiddie T V and Haas H L (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the *in vitro* rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol Lond*. **369**: 365-377

Acknowledgements. Authors are grateful to Dagoberto Tapia and Carmen Vilchis for their technical assistance, and to Dr. Gutiérrez-Ospina for helpful criticisms of the manuscript. The authors also thank Karl Thomae (GmbH, Germany) for the generous gift of AFDX-116. EHE was fellow of DGAPA-UNAM. This work was supported by grants from CONACYT-México (0115P-N) and DGAPA-UNAM (IN201597)

- Kahle J.S. and Colman C.W. (1993) Adenosine, L-AP4, and baclofen modulation of paired-pulse potentiation in the dentate gyrus: interstimulus interval-dependent pharmacology. *Exp. Brain Res.* 94: 97-104
- Kenakin T. and Boxsell C. (1989) Pharmacologic discrimination between receptor heterogeneity and allosteric interaction: Resultant analysis of gallamine and pirenzepine antagonist of muscarinic in rat trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 944-952
- Kita T., Kita H. and Kitai S.T. (1985) Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. *Brain Res.* 361: 10-18
- Kobayashi K., Sakaba T. and Tachibana M. (1995) Potentiation of Ca^{2+} transients in the presynaptic terminals of goldfish retinal bipolar cells. *J. Physiol. (Lond)* 482: 7-13
- Lovinger D.M., Tyler E., Fidler S. and Mermi A. (1993) Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J. Neurophysiol.* 69: 1236-1244
- McGeer, P. L. and McGeer E.G. (1993) Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. *Adv. Neurosci.* 60: 93-96
- McKinney M. (1993) Muscarinic receptor subtype-specific coupling to second messenger in neuronal systems. *Prog. Brain Res.* 98: 333-340
- Malenka R.C. and Kocsis J.D. (1988) Presynaptic actions of carbachol and adenosine on cortical synaptic transmission studied *in vitro*. *J. Neurosci.* 8: 3750-3756
- Michel A.D., Delmendo R.E., López M. and Whiting R.L. (1990) On the interaction of gallamine with muscarinic receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 182: 335-345
- Nisenbaum E. and Berger T.W. (1992) Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs. *In vitro analysis*. *Neurosci.* 48: 579-593

- Dutar P. and Nicoll R.A. (1988) Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messenger systems. Electrophysiological studies *in vitro*. *J. Neurosci.* 8: 4214-4224
- Fiedorush I.A. and Guinick M.J. (1995) Paired-Pulse Facilitation of IPSCs in slices of immature and mature mouse somatosensory neocortex. *J. Neurosci.* 15: 2591-2595
- Foces-Hernández J., Galaraga E., Pineda J.C. and Bargas J. (1994) Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J. Neurophysiol.* 72: 2246-2256
- Foces-Hernández J., Galaraga E. and Bargas J. (1997) Dopamine Selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25: 185-195.
- Hernández E., Galaraga E. and Bargas J. (1996) Cholinergic pre-synaptic modulation of glutamatergic afferents to the neostriatum as seen with paired pulse facilitation and 4-AP-induced release. *Soc. Neurosci. Abs.* 22: 410
- Hersch S.H. and Levey A.I. (1995) Immunocytochemical localization of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in the striatum. In: *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function* (Añazo M.A. and Summeier D. J. Eds) pp. 35-44. Landes, Austin TX.
- Hosokawa A. and Armstrong W.E. (1988) A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Meth.* 25: 1-11
- Hsu K.S., Huang C.C. and Gean P.W. (1995) Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M_2 receptors in the rat neostriatum. *Neurosci. Lett.* 197: 141-144
- Jiang Z.G. and North R.A. (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons *in vitro*. *J. Physiol. (Lond)* 443: 533-553

FIGURE LEGENDS

- Figure 1.** Muscarinic agonists inhibit 4-AP induced glutamate release. A. Records of representative 4-AP-induced EPSPs. B. Time course of carbachol ($1 \mu\text{M}$) action upon the frequency of 4-AP-induced EPSPs. Frequency reduction by carbachol was reversed by atropine ($1 \mu\text{M}$). C. Cumulative amplitude distributions of 4-AP-induced EPSPs recorded before and during carbachol show that the reduction in frequency occurred without significant changes in the mean amplitude of the EPSPs. $10 \mu\text{M}$ bicuculline were present during the experiment
- Figure 2.** Muscarinic agonists increase PPF. A, B. Pairs of EPSPs recorded in control saline (top row). Note some degree of PPF. First and second EPSPs are superimposed at right (correcting for basal membrane potential). The addition of $1 \mu\text{M}$ carbachol or 20 nM muscarine (middle row in A and B) increased PPF for the same stimulus strength. Note a greater reduction of the first EPSP in both cases. The addition of $1 \mu\text{M}$ atropine (third row) in the continuous presence of the muscarinic agonists greatly reduced their actions on PPF. At bottom there is a superimposition of the first EPSPs at each row
- Figure 3.** Nanomolar concentrations of muscarine do not affect post-synaptic membrane properties. Transmembrane voltage responses (bottom) to rectangular current steps (top) from a MSN in control saline (A) and in the presence of 20 nM muscarine (B). C. Current-voltage relationships in both conditions constructed from records in A and B
- Figure 4.** Atropine induced paired pulse depression. A. Stimulus strength was adjusted to obtain a small PPF in control saline (Control). In this situation, the addition of $1 \mu\text{M}$ atropine blocked this PPF (Atropine) and induced a small paired pulse depression (PPD, note that the first EPSP becomes larger than the second). B. PPF observed in control conditions (Control)

- Pineda J C, Vargas J, Flores-Hernández J and Galarreta E (1995) Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281: 271-277
- Thesleff S (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. *Neurosci* 5: 1413-1419
- Wason CJ (1990) Basal Ganglia. In *The Synaptic Organization of the Brain* (Shepherd G M Ed) pp 279-316. Oxford University Press, Oxford
- Wason C J and Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 16: 2397-2410
- Wu L-G and Saggau P (1994) Presynaptic calcium is increased during synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 14: 645-654

was greatly increased by 20 nM muscarine (bottom) even in the presence of 500 nM of the muscarinic M_1 receptor antagonist pirenzepine

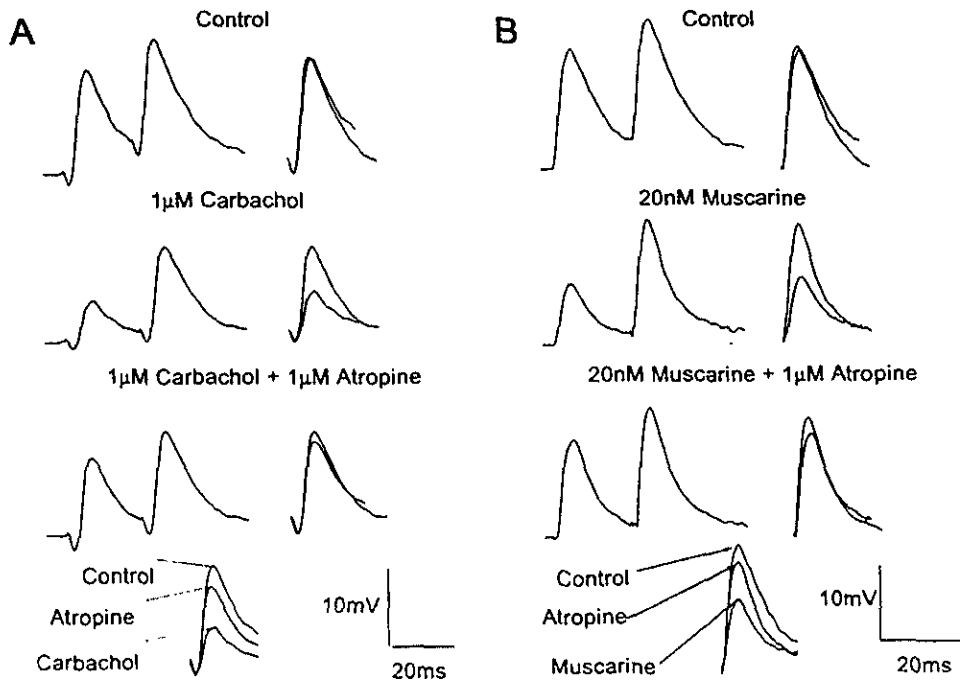
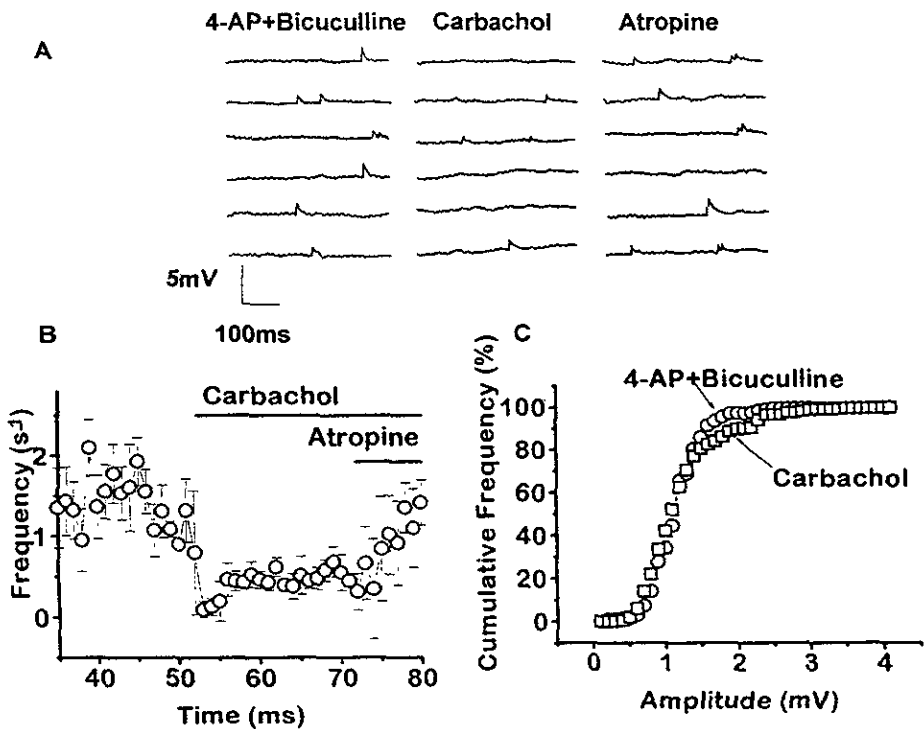
Figure 5 Several muscarinic M_2 receptor antagonists blocked PPF induced by

muscarine. A. Top row: little PPF is seen in control saline; middle row: administration of 20 nM muscarine plus 100 nM gallamine does not induce an increase in PPF; bottom row: washing off gallamine and leaving muscarine in the bath induces PPF and a decrease in EPSPs; ampicillin B, C. The same protocol was repeated for 50 nM AFDX-116 (B) and 15 nM 3- α -chloropemphaline (C). In all cases washing off the antagonist while leaving the agonist induced an increase in PPF. Insets at the right of each pair of EPSPs illustrate superimpositions of the first and second EPSPs.

Figure 6 A muscarinic M_2 receptor antagonist, the irreversible 4-DAMP mustard, also blocked the muscarine induced PPF. Top row shows a pair of evoked EPSPs in control saline stimulus strength induces some degree of PPF. Middle row illustrates the effect of 20 nM muscarine, note the PPF enhancement. Bottom row shows that the addition of 10 nM 4-DAMP blocks the PPF induced by muscarine. Right column illustrates superimpositions of the first and second synaptic responses

Figure 7 Concentration-response relationships for different muscarinic receptor

antagonists. From left to right curves represent concentration-response plots for 3- α -chloropemphaline (circles: EC_{50} = 650 pM, Hill coefficient = 1.9); 4-DAMP (squares: EC_{50} = 1.1 nM, Hill coefficient = 1.4) and AFDX-116 (diamonds: EC_{50} = 3.0 nM, Hill coefficient = 1.3). Gallamine (downward triangles) and pirenzepine (upward triangles) do not have a complete concentration-response plot and needed higher concentrations to block the PPF induced by 20 nM muscarine



Membrane Potential (mV)

