



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**Plasticidad de las respuestas sinápticas de las células
piramidales de CA3 a la estimulación del giro dentado.**

Tesis

que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

presenta

Héctor Romo Parra

Director de Tesis: Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Ciudad Universitaria.

2005

M 347322



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Aector M. Acemo Parra

FECHA: 29 Agosto 2005

FIRMA: 

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV. Agradezco a José Ayala Dávila, Benjamín Muñoz y Beatriz Osorio por su excelente asistencia técnica.

RESUMEN

Las células granulares del giro dentado son consideradas como excitadoras debido a que liberan glutamato. Se ha descrito que después de ser sometidas a actividad intensa (por ejemplo, crisis epilépticas), también pueden liberar GABA transitoriamente. En estas condiciones, las células granulares expresan también de manera temporal los marcadores del fenotipo GABAérgico: la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₇), el ácido gamma amino butírico (GABA) y el mRNA para el transportador vesicular del GABA (VGAT).

Además, la estimulación del giro dentado en presencia de bloqueadores de los receptores a glutamato y GABA, produce en las células piramidales una respuesta excitadora lenta, que es debida a la activación de receptores muscarínicos M1. En conjunto, ésta evidencia sugiere que las respuestas glutamatérgica, GABAérgica y colinérgica pudieran tener su origen en las fibras musgosas (FM; axones de las células granulares). Esta hipótesis es sugerida por la pluripotencialidad de las células progenitoras que dan origen a las células granulares en el adulto ya que se pueden diferenciar en glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas in vitro (Toda y cols., 2000; Vicario-Abejon y cols., 2000).

Por otro lado, Walker y colaboradores (2001) mostraron que es posible registrar respuestas GABAérgicas monosinápticas por la activación de las fibras musgosas en cobayos jóvenes en condición control, es decir, en ausencia de incremento de excitabilidad de las células granulares. Esto sugiere que las respuestas colinérgicas y GABAérgicas evocadas por la estimulación del giro dentado pudieran presentarse normalmente, aunque de manera transitoria, durante el desarrollo.

En el presente trabajo de tesis, por medio de técnicas electrofisiológicas, decidimos caracterizar las respuestas colinérgicas y GABAérgicas provocadas por la estimulación del giro dentado y su interacción en la neurona postsináptica en CA3 en ratas con crisis convulsivas. Para determinar el origen identificamos su modulación presináptica por receptores metabotrópicos al glutamato (mGluR), ya que las respuestas de las fibras musgosas son selectivamente inhibidas por su activación. Finalmente pusimos a prueba la hipótesis de que, la transmisión colinérgica y GABAérgica evocada por la estimulación del giro dentado se presenta normalmente durante el desarrollo.

Nuestros resultados muestran que la estimulación del GD en ratas adultas control produce un potencial postsináptico excitador (EPSP) seguido de dos potenciales postsinápticos inhibidores (IPSP) en las células piramidales de CA3. Debido a que todas las respuestas sinápticas son bloqueadas por antagonistas de los receptores a glutamato, se confirma que la transmisión inhibitoria es polisináptica. En contraste, en ratas sometidas a crisis convulsivas, la estimulación del GD en presencia de antagonistas a receptores ionotrópicos al glutamato

(GluR) provoca un IPSP monosináptico. Después del bloqueo del IPSP con bicuculina se observó un EPSP lento que se bloquea con los antagonistas al receptor colinérgico M1: pirenzepina, atropina y toxina MT7. Si el bloqueo de los receptores muscarínicos se hace antes de bloquear a los receptores de GABA, la amplitud y duración de los IPSP monosinápticos se incrementa. Esto sugiere que se modulan por interacción de ambas señales en la neurona postsináptica. Con ayuda de inmunocitoquímica, determinamos que la señal colinérgica no proviene de las FM sino de una proyección axonal, probablemente proveniente del séptum, que atraviesa el GD. Sugerimos que esta proyección es normalmente silente ya que sólo genera respuestas en CA3 después de la presencia de crisis convulsivas.

Finalmente, demostramos que la estimulación del GD en ratas en desarrollo normalmente produce respuestas GABAérgicas monosinápticas pero no respuestas colinérgicas. Las respuestas GABAérgicas son despolarizantes durante la primera semana de vida (debido a que el gradiente para el Cl⁻ se encuentra invertido) y, a partir de la segunda, son hiperpolarizantes. Determinamos que la transmisión GABAérgica proveniente de las FM desaparece súbitamente entre los días 22 y 23 de edad, al tiempo que desaparecen los marcadores del fenotipo GABAérgico en las CG. Estas respuestas GABAérgicas tienen el perfil farmacológico característico de las FM ya que son inhibidas por la estimulación de receptores metabotrópicos al glutamato del grupo III.

Estos resultados ponen de manifiesto que la transmisión de información de las CG a CA3 es sumamente plástica. Durante la primera semana de vida, la señal GABAérgica provee la despolarización necesaria para la activación de los receptores NMDA y posiblemente tiene funciones tróficas. En el adulto, cuando la transmisión del GD es netamente glutamatérgica, incrementos de excitabilidad producen la expresión del fenotipo GABAérgico en las CG, probablemente como un mecanismo protector. Esta evidencia nos permite sugerir que la transmisión GABAérgica y colinérgica emergentes regulan la actividad oscilatoria espontánea de CA3 que está involucrada en procesos de sincronización, memoria y aprendizaje.

CAPITULO 1

EI HIPOCAMPO

Introducción.

El hipocampo forma parte del lóbulo temporal y es una de las regiones del sistema nervioso central más estudiadas por tres razones principales: a) Posee regiones claramente identificables ya que es una estructura estratificada (Amaral y Witter, 1989b; Witter y Amaral, 1991); b) Participa en funciones cognitivas superiores como el aprendizaje y la memoria (Scoville y Milner, 1957; Zola-Morgan y cols., 1989; para revisión ver: Morgado, 2005; Thompson, 2005) y c) las alteraciones en su funcionamiento se han relacionado con procesos patológicos como la epilepsia del lóbulo temporal (Margerison y Corsellis, 1966), la depresión (Sheline y cols., 2002) y la enfermedad de Alzheimer (Yakel y Shao, 2004).

Anatomía

En las ratas, el sistema septo-hipocampal incluye a la formación hipocampal, el área septal, sus interconexiones y las vías aferentes y eferentes que conectan estas regiones con otras áreas del cerebro. El séptum y el hipocampo están conectados a través de dos regiones anatómicas: la fimbria y el fórnix dorsal (figura 1.1).

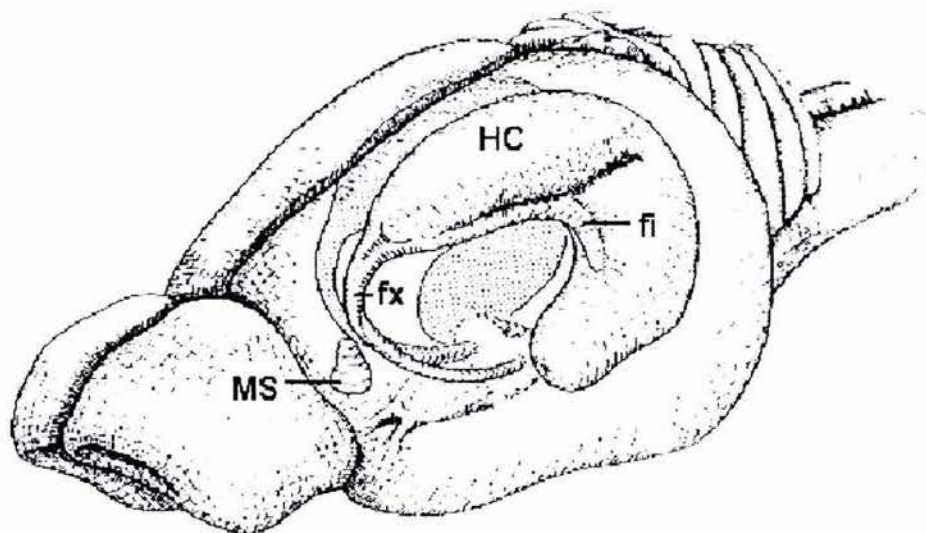


Figura 1.1. Esquema tridimensional de la organización del sistema septo-hipocámpal en el cerebro de ratona. El hipocampo es la estructura que tiene forma de "C". Abreviaturas: fx = fórnix; fi = fimbria; HC = hipocampo; MS = séptum medio (modificado de: Amaral y Witter, 1989a).

La *formación hipocámpal* comprende seis subregiones: el Giro dentado (GD), el hipocampo, el *subículo*, el *presubículo*, el *parasubículo* y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989b; Witter y Amaral, 1991). El hipocampo es una estructura curva en forma de "C" (figura 1.1) que proviene de la línea media anterior que pasa por debajo del cuerpo calloso y es caudal al séptum. De aquí el hipocampo se curva en dirección posterolateral hacia la corteza occipital (Gaarskjaer, 1986). Ramón y Cajal (1911) describió el hipocampo como una estructura que está dividida en dos regiones: hipocampo superior e hipocampo inferior. Posteriormente, Lorente de Nó (1934), subdividió al hipocampo en cuatro regiones o campos: CA1-CA4 (CA = Cuerno de Amón). La región CA1 es adyacente al subículo y contiene células piramidales. La región CA2 es una región transitoria que está compuesta por células piramidales pequeñas y largas que no están en contacto con los axones de las células granulares (CG) del giro dentado. La región

CA3 es adyacente al GD y está compuesta de células piramidales que reciben contactos sinápticos de los axones de las CG que son llamados fibras musgosas (FM). La región CA4 corresponde al *hilus* (Gaarskjaer, 1986; figura 1.2).

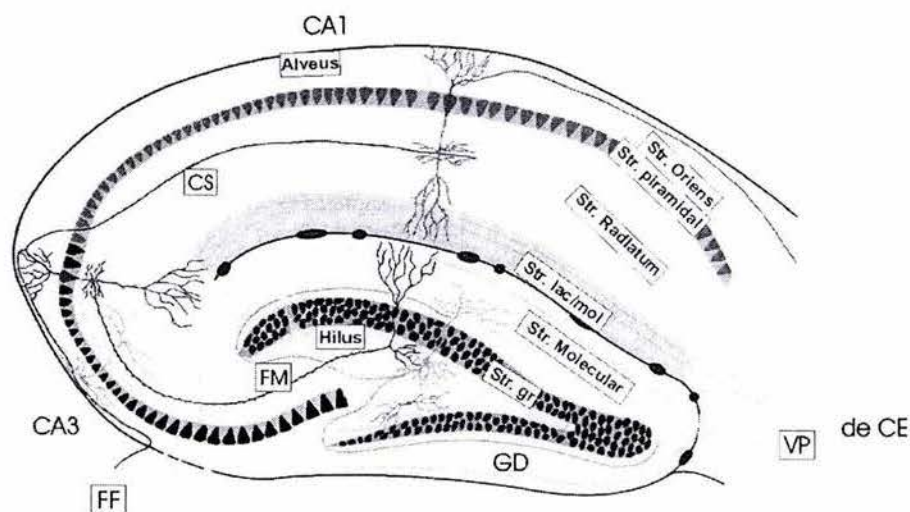


Figura 1.2. Esquema del circuito trisináptico del hipocampo en un corte parasagital. Se muestran las diferentes capas que forman el hipocampo. Abreviaturas: str. =stratum; str. gr. = stratum granular; CE = corteza entorrinal; GD = giro dentado; VP = vía perforante; FM = fibras musgosas; CS = colaterales de Schaffer; FF = fimbria-fórnix (modificado con permiso de <http://www.uni-leipzig.de/~vetana/>).

La sección transversal del hipocampo permite observar que las células están empaquetadas en distintas capas, lo que da a esta estructura una organización laminar característica (figura 1.2); estas láminas son: a) *Alveus*, contiene los axones de las células piramidales de CA1 que van directamente hacia la fimbria y el subículo; b) *Stratum Oriens*, es la capa que está entre el *alveus* y los somas de las células piramidales. Dicha capa contiene a las dendritas basales de las células piramidales, algunas células en cesta y fibras colinérgicas de origen septal; c) *Capa Piramidal*, está compuesta por los somas de las células piramidales; d) *Stratum Radiatum*, contiene el segmento proximal del árbol dendrítico de las células piramidales y, por último, e) *Stratum Lacunosum Moleculare*, donde se encuentra el segmento distal del árbol dendrítico apical. Además, en la región CA3

la zona donde cursan las fibras musgosas (axones de las CG) se conoce como *Stratum Ludicum* (Amaral y Dent, 1981; Cassell y Brown, 1984; Claiborne y cols., 1986).

El giro dentado está formado por tres capas: a) Capa Granular, contiene los somas de las células granulares; b) Capa Molecular, formado por el primer tercio proximal de las dendritas apicales de las células granulares; y c) Capa polimórfica o *hilus*, contiene el segmento inicial de los axones de las células granulares. (Blackstad , 1956; Amaral, 1978; Scharfman, 1991)

Las conexiones intrahipocampales forman un circuito trisináptico, que está compuesto por las células del giro dentado, CA3 y CA1 (figura 1.2) (Amaral y Witter, 1989b; Burwell y cols., 1995). La fisiología del hipocampo puede ser explicada en función de este circuito trisináptico.

La primera conexión sináptica de este circuito es la formada por la corteza entorrinal y el giro dentado. Las células de la capa II de la corteza entorrinal activan a las células granulares a través de la vía perforante (lateral y medial) y proveen al hipocampo la principal entrada glutamatérgica. La segunda sinapsis está formada por el giro dentado y la región CA3. Las fibras musgosas, hacen contacto con las dendritas basales proximales de las células piramidales y con interneuronas en la región CA3 (ver Cap 2). Las células piramidales de CA3 proyectan dos tipos de axones. Los axones principales que salen del hipocampo a través de la fimbria/fórnix hasta conectarse con el séptum lateral y cuerpos mamilares. Estos axones principales no forman parte del circuito trisináptico. Los segundos se conocen como colaterales de Schaffer y hacen sinapsis con las células piramidales de la región CA1. Estas colaterales forman la tercera sinapsis

del circuito. Finalmente, las células piramidales de CA1 proyectan a través del *alveus* hacia el subículo y proyectan a las capas profundas de la corteza entorrinal (V y VI) (Amaral, 1978; Amaral y Witter, 1989b).

El hipocampo proyecta a su contraparte en el otro hemisferio a través de las comisuras y mantiene conexiones subcorticales vía la *fimbria/fórnix* hacia el *séptum*. A su vez, existen conexiones noradrenérgicas del *locus coeruleus*; serotoninérgicas, del núcleo del *raphe*; histaminérgicas, de los núcleos supramamilares; dopaminérgicas, procedentes del área tegmental ventral, la sustancia nigra y de la corteza entorrinal a través de la vía perforante y entradas colinérgicas procedentes del séptum (Dutar y cols., 1995). Todas estas vías proveen principalmente de inhibición a las células piramidales (Gulyas y Freund, 1996; Henze y cols., 2000).

Tipos celulares en el hipocampo.

La red neuronal del hipocampo está compuesta por células glutamatérgicas: células granulares y células piramidales (Freund y Buzsaki, 1996); y células GABAérgicas: interneuronas. Estos tipos celulares se describen a continuación.

a) Células granulares.

Las células principales del GD son las células granulares. Se considera que el GD de una rata adulta contiene aproximadamente un millón de células granulares (Gaarskjaer, 1978a; Gaarskjaer, 1978b; Boss y cols., 1985) y 15 millones en el humano (Boss y cols., 1985). Estas células son glutamatérgicas que contienen y liberan: dinorfina (McGinty y cols., 1983; Chavkin, 2000), encefalina (Gall y cols., 1981), Zinc (Wenzel y cols., 1997; Molnar y Nadler, 2001), factor neurotrófico

derivado del cerebro (BDNF) (Gall y Lauterborn, 1992; Lowenstein y Arsenault, 1996) y otros péptidos como somatostatina, neuropéptido Y, neuroquinina B y colecistoquinina (Tonder y cols., 1994; Schwarzer y cols., 1995).

El cuerpo celular de este tipo celular tiene forma esférica u oval y mide aproximadamente 10 μm y su núcleo entre 5 y 10 μm (Laatsch y Cowan, 1966; Dashtipour y cols., 2001) y contiene un nucleolo prominente localizado en la periferia del núcleo (Ribak y Anderson, 1980). Las CG forman una sola capa de aproximadamente 60 μm de grosor. En general, se pueden diferenciar dos tipos de células granulares: a) El primer tipo corresponde a células con múltiples dendritas primarias: éstas contienen entre 2 y 5 dendritas procedentes del soma con un diámetro de 2 a 3 μm (Dashtipour y cols., 2001). Forman un árbol dendrítico que se encuentra orientado perpendicularmente a la capa granular con una longitud alrededor de 2.2 mm (Amaral y cols., 1990; Claiborne y cols., 1990). La mayoría de estas dendritas están cubiertas por espinas, forman la capa molecular y llegan hasta la fisura hipocampal (Claiborne y cols., 1990; Frotscher, 1992; Yan y cols., 2001); b) El segundo tipo de células granulares son del tipo bipolar. De un polo se extiende la dendrita primaria la cual surge del polo apical y se ramifica en un árbol dendrítico que se encuentra restringida a la capa granular (Desmond y Levy, 1982; Duffy y Rakic, 1983; Williams y Matthysse, 1983; Green y Juraska, 1985). Por el otro polo desciende un solo axón y se dirige hacia el hilus (Laatsch y Cowan, 1966; Gaarskjaer, 1978a; Gaarskjaer, 1978b; Gaarskjaer, 1986).

Los axones de las células granulares se llaman fibras musgosas. En los roedores las fibras musgosas surgen de la porción basal de las células granulares, pasan por el hilus y proyectan a CA3 en una banda llamada *stratum lucidum*. Esta banda

corresponde a los 100 μm proximales de las dendritas apicales de las células piramidales de CA3 y llega hasta antes de tocar la región CA2 (Henze y cols., 2000). Las FM son axones no mielinizados cuyo diámetro aproximado es de 0.1-0.7 μm (Gaarskjaer, 1986; Claiborne y cols., 1986). Por otro lado, inmediatamente después de salir de la capa de las células granulares en el giro dentado, dan origen a un grupo de colaterales finas (generalmente menos de 2 μm) los cuales proveen de entrada a las células polimórficas del *hilus* (Acsady y cols., 1998; Acsady y cols., 2000). Las fibras musgosas tienen 3 tipos de terminales: los botones gigantes, las proyecciones en passant y las extensiones filopoidales. Se considera que las primeras inervan preferentemente a las células piramidales mientras que las últimas dos inervan a las interneuronas (Blackstad y Flood, 1963; Amaral, 1979; Claiborne y cols., 1986; Chicurel y Harris, 1992; Acsady y cols., 1998; Maccaferri y cols., 1998; Acsady y cols., 2000).

Cada fibra musgosa hace aproximadamente entre 140 y 150 sinapsis con las interneuronas y 10-14 sinapsis con células piramidales (Acsady y cols., 1998).

b) Células musgosas.

Son interneuronas glutamatérgicas que se encuentran restringidas al *hilus* (Acsady y cols., 2000) bajo la capa granular (Henze y cols., 2000). Son las células del *hilus* que tienen menos contactos sinápticos con las fibras musgosas (Acsady y cols., 1998).

c) Células piramidales.

Las células piramidales son células glutamatérgicas. Están arregladas en una capa conocida como capa piramidal que se encuentra a todo lo largo del cuerno de Amón y tiene un grosor aproximado de 3 a 6 células piramidales. Los cuerpos

celulares tienen forma de pirámide (de ahí su nombre) y son multipolares. En promedio miden de 20-40 μm en la base y de 40-60 μm de altura aunque varían en cuanto a su tamaño a lo largo del hipocampo; en la región CA3 son de tamaño mayor en comparación con las de la región CA1 (Shepherd, 1996; Lubke y cols., 1998; Mirsky y cols., 1998; Gonzales y cols., 2001).

El árbol dendrítico se extiende de forma perpendicular a la capa piramidal en ambas direcciones y está cubierto de espinas donde se reciben entradas excitadoras. Las células cercanas al GD tienen un árbol dendrítico más pequeño que células piramidales localizadas en la región más distal de CA3 (Ishizuka y cols., 1995). Las dendritas apicales son delgadas (entre 5 y 10 μm de grosor) y pasan por el *stratum radiatum* hasta el *stratum lacunosum-moleculare*. La longitud de las dendritas apicales es de 200-300 μm (Shepherd, 1996). Las dendritas basales son más numerosas y su grosor es de 3 a 6 μm , están ramificadas y se localizan en el *stratum oriens* (Bannister y Larkman, 1995; Lubke y cols., 1998; Gonzales y cols., 2001).

d) *Interneuronas*

Son células locales con blancos postsinápticos restringidos. Sus dendritas no contienen espinas y generalmente utilizan el neurotransmisor inhibitor GABA (Buzsaki, 1984; Freund y Gulyas, 1997; Lubke y cols., 1998). A este tipo celular corresponden el 10% de las neuronas del hipocampo (Olbrich y Braak, 1985).

Las interneuronas se clasifican de acuerdo con la distribución de su axón y su blanco postsináptico (Gulyas y cols., 1993), aunque con los avances en la detección de marcadores moleculares, recientemente se han originado clasificaciones de acuerdo al contenido de éstos (ver abajo; figura 1.3).

- a) Células axo-axónicas o de "candelabro" (chandelier) son inmunorreactivas a parvalbúmina (Freund y Buzsaki, 1996; Somogyi y Klausberger, 2005). Estas interneuronas inervan los segmentos iniciales de los axones de las células piramidales (Soriano y Frotscher, 1989; Freund y Buzsaki, 1996) y actúan sobre las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2/3$ y $\gamma 2$ de los receptores GABA_A (Nusser y cols., 1996; Somogyi y cols., 1996). Debido a esta inervación estas interneuronas ejercen control sobre la generación del potencial de acción. De 4 a 10 interneuronas de este tipo inervan a cada célula piramidal (Li y cols., 1992). Las dendritas de estas interneuronas están orientadas de forma radial en el stratum lacunosum-moleculare y no tienen espinas (Buhl y cols., 1994).
- b) Células en cesta típicas. Son las interneuronas más abundantes en el hipocampo (Scharfman, 1991; Freund y Buzsaki, 1996; Freund y Gulyas, 1997; Jones y Yakel, 1999). Son inmunorreactivas a parvalbúmina (PV), colecistoquinina (CCK), transportador vesicular al glutamato 3 (VGLUT3) y/o Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) (Freund y Buzsaki, 1996; Somogyi y Klausberger, 2005). En el giro dentado se localizan entre la capa granular y el *hilus*. El soma tiene un tamaño de 3 a 6 μm . Los axones hacen contacto sináptico con los somas de las células granulares. En el hipocampo, este tipo de interneuronas, se localizan entre el borde de la capa piramidal y el *stratum oriens*. Recientemente se reportó un subtipo que se encuentra localizado en el *stratum lacunosum-moleculare* (Somogyi y Klausberger, 2005). Las dendritas basales se encuentran en el *stratum*

oriens y las dendritas apicales en el *stratum radiatum* (Jones y Yakel, 1999), sin embargo, algunas dendritas pueden llegar hasta el *stratum lacunosum-molecular*. No contiene espinas aunque en algunas zonas del hipocampo presentan apéndices cortos. Los axones de las células en cesta típicas se encuentran entre la capa piramidal y el *stratum oriens* y en CA3 algunas colaterales están en *stratum lucidum*. Los axones hacen sinapsis con 1,500 a 2,500 células piramidales (Gulyas y cols., 1993; Freund y Buzsaki, 1996).

- c) Células en cesta atípicas. Se clasifican en dos tipos (Gulyas y cols., 1993). El primer tipo tiene un axón extenso. La mayoría de sus colaterales se encuentra en la capa piramidal, *stratum lucidum*, *stratum oriens* y en el *stratum radiatum*. Estas interneuronas hacen contactos con el soma de las células piramidales y sus dendritas se extienden por toda la capa piramidal. El segundo tipo son las células en cesta del *stratum lucidum*. Son inmunoreactivas a CCK y VIP. El soma de este tipo de interneuronas se ubica entre el *stratum oriens* y la capa piramidal. Las dendritas surgen de la parte apical y basal de la interneurona y corren hacia el *stratum radiatum*. Los axones se localizan en la capa piramidal y en el *stratum lucidum* (Gulyas y cols., 1993).
- d) Células con arborización axonal ubicada en la zona dendrítica de las células piramidales. Este tipo inerva los diferentes segmentos del árbol dendrítico de las células piramidales (Freund y Buzsaki, 1996). Se clasifica en cuatro grupos: 1) Células *Oriens-Lacunosum Molecular* (O-LM); 2) Células

trilaminares y biestratificadas; 3) Células del *Stratum Radiatum*; y por último, 4) Células del *Stratum Lacunosum-Molecular*.

1) Células O-LM. Este tipo de interneuronas están orientadas entre estas dos capas. El axón está restringido al *stratum lacunosum-molecular* y el árbol dendrítico al *stratum oriens* junto con las colaterales recurrentes de las células piramidales. Estas colaterales terminan junto con las aferentes de la corteza entorrinal. Las células O-LM son inmunorreactivas a somatostatina (SM), PV, neuropéptido Y (NPY) (Freund y Buzsaki, 1996) y a los receptores metabotrópicos al glutamato mGluR1 α (extrasináptico) y mGluR7 (presináptico) (Somogyi y Klausberger, 2005).

2) Células trilaminares y biestratificadas. Las interneuronas del tipo biestratificado se encuentran localizadas en la capa piramidal y en el *stratum oriens*. Sus axones hacen sinapsis en el *stratum oriens* y el *stratum radiatum* sobre las dendritas basales y apicales de las células piramidales (Amaral y Woodward, 1977; Pitkanen y Amaral, 1993; Ishizuka y cols., 1995). Las dendritas de las células biestratificadas no contienen espinas; son multipolares y se bifurcan cerca del soma. Este tipo de interneuronas son inmunorreactivas a PV, somatostatina, NPY y al subunidad α de los receptores GABA_A. Las células trilaminares se subdividen en horizontales y radiales de acuerdo a su orientación (Miles y cols., 1996; Halasy y cols., 1996). Las dendritas corren de forma horizontal por el *stratum*

oriens y el *alveus* y se extienden por varios cientos de micrómetros en dirección transversal y septo-temporal (Sik y cols., 1995; Sik y cols., 1997). El axón tiene contactos en el *stratum oriens*, capa piramidal y *stratum radiatum* (Sik y cols., 1995). Son inmunorreactivas a calbindina (Freund y Buzsaki, 1996) receptores muscarínicos m2 y receptores mGluR8a (Somogyi y Klausberger, 2005).

3) Células del *stratum radiatum*. Son interneuronas que tienen su soma en el *stratum radiatum* y la capa piramidal. Sus axones y dendritas están en el *stratum radiatum*. Las dendritas no tienen espinas aunque algunas presentan varicosidades (Kawaguchi y Hama, 1987; Gulyas y cols., 1993; Miles y cols., 1996).

4) Células del *stratum lacunosum-moleculare*. Sus cuerpos celulares se encuentran restringidos al *stratum lacunosum-moleculare* aunque algunas están cercanas al *stratum radiatum*. Las dendritas se encuentran orientadas horizontalmente y, aunque no contienen espinas, presentan varicosidades. Los axones se originan en la dendrita proximal principal (Freund y Buzsaki, 1996). Son inmunorreactivas a CCK.

HIPOCAMPO REGION CA3

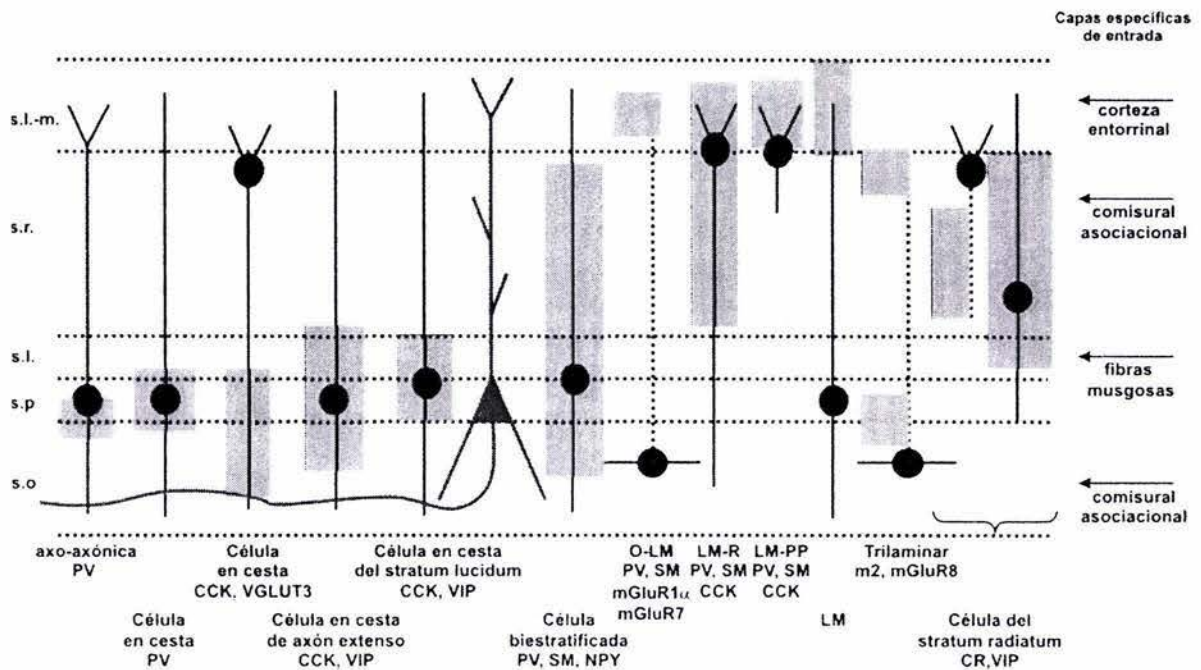


Figura 1.3. Diagrama donde se muestran los diferentes tipos de interneuronas de la región del hipocampo y la zona donde tienen contactos. Las interneuronas inervan diferentes porciones de las capas del hipocampo. Los círculos representan a los cuerpos celulares, las líneas oscuras que surgen de los círculos representan la orientación y la distribución de las dendritas, las líneas punteadas que surgen de los círculos representan la dirección que toman los axones. Los rectángulos en gris representan la arborización axonal. Las flechas muestran la distribución laminar de las entradas excitadoras. Abreviaturas: sl-m = stratum lacunosum-moleculare; sr = stratum radiatum; sl = stratum lucidum; sp = stratum pyramidale; so = stratum oriens; PV = parvalbúmina; CCK = colecistoquinina; VGLUT = transportador vesicular del glutamato; VIP = polipéptido intestinal vasoactivo; SM = somatostatina; NPY = neuropéptido Y; mGluR = receptor metabotrópico de glutamato; m2 = receptor muscarínico m2 (modificado de: Freund y Buzsaki, 1996; Somogyi y Klausberger, 2005).

En el hilus se ha descrito una gran variedad de interneuronas (Amaral, 1978). Algunas de estas interneuronas tienen axones restringidos al hilus y otras tienen axones que inervan la capa granular y molecular del giro dentado (Freund y Buzsaki, 1996). Recientemente se han descrito dos tipos de interneuronas que sus axones corren en paralelo con las fibras musgosas en el *stratum lucidum* y en el *hilus*. Las descritas por Vida y Frotscher (2000) tienen sus terminales en contacto con dendritas apicales proximales de células piramidales, con interneuronas inhibitorias y con células musgosas. Las dendritas están localizadas en el *stratum radiatum* y *stratum oriens*. Este tipo de interneuronas están activadas por fibras

comisurales y de asociación y reciben una entrada colinérgica (Vida y Frotscher, 2000). El segundo tipo (Grosse y cols., 2003) se caracteriza por tener canales de potasio Kir 3.3 en el axón. Estas interneuronas se localizan entre el stratum oriens y la capa piramidal de CA3. Sus axones atraviesan la capa piramidal y hacen contacto sináptico con las FM.

Recientemente se reportó una clasificación de al menos 16 tipos de interneuronas de la región CA1 (Somogyi y Klausberger, 2005). De las cuales 12 tipos inervan dominios específicos de las células piramidales y cuatro tipos inervan a otras interneuronas.

NEUROTRANSMISORES EN EL HIPOCAMPO

Glutamato

El glutamato es el neurotransmisor presente en las vías principales de la formación hipocampal (Baudry y Lynch, 1981): las células principales de las capas II y III de la corteza entorrinal, las células granulares y las células piramidales del hipocampo.

Síntesis.

La síntesis del glutamato se realiza en las terminales nerviosas por dos procesos (figura 1.4):

- a) Conversión de la glutamina a glutamato por medio de la acción enzimática de la glutaminasa. La glutamina es liberada de las células gliales y ésta a su vez capturada por las terminaciones presinápticas.
- b) De la glucosa vía el ciclo de Krebs y la transaminación del α -cetoglutarato.

En los astrocitos la glutamina es oxidada, a través del ciclo de Krebs en α -cetoglutarato.

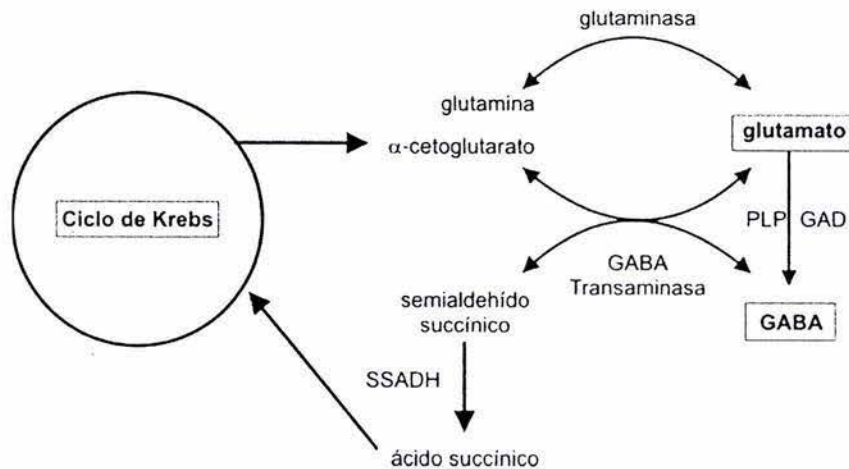


Figura 1.4. Esquema de la síntesis de glutamato y GABA. Nótese la relación con el ciclo de Krebs y la relación entre ambos. Abreviaturas: GAD = descarboxilasa del ácido glutámico; PLP = fosfato de piridoxal, SSADH = semialdehído succínico deshidrogenasa (tomado y modificado de: Olsen y DeLorey, 1999; Dingley y McBain, 1999).

El almacenamiento del glutamato sintetizado se realiza en vesículas a través de un transportador vesicular específico (Liu y cols., 1996)

Después de su liberación el glutamato es eliminado de la hendidura sináptica por los transportadores de glutamato de alta afinidad y es degradado en las células gliales por la enzima glutamina sintetasa que convierte el glutamato en glutamina.

Receptores.

Existen dos grandes grupos de receptores al glutamato: receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Bernard y cols., 1997).

Los receptores ionotrópicos están divididos en tres tipos (Greenamyre, 1986):

- a) Activados por N-metil- D-aspartato (NMDA): Son tetrámeros compuestos de una subunidad principal (NR1) y de una o más subunidades auxiliares (NR2A-D) (McBain y cols., 1999). Son permeables a Na^+ y Ca^{++} . Están bloqueados por Mg^{++} a potenciales de membrana en reposo (Hollmann y

Heinemann, 1994).

- b) Activados por ácido α amino-3-hidroxi-5-metilisoaxolapropionico (AMPA): Están compuestos de cuatro subunidades (GluR1-GluR4) (Healy y Meador-Woodruff, 2000). Son permeables a Ca^{++} (Vignes y Collingridge, 1997) y la subunidad relacionada con esta permeabilidad es la GluR2. Cuando la GluR2 está presente el receptor AMPA es permeable a Ca^{++} (McBain y cols., 1999).
- c) Activados por kainato: Están compuestos por las subunidades GluK5-7 y KA1-2. Se ha demostrado que tres subunidades del receptor de kainato forman canales iónicos funcionales cuando se expresan homoméricamente en sistemas recombinantes mientras que las otras subunidades denominadas KA1 y KA2 al parecer modifican las propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores de kainato restantes (GluK5, GluK6 y GluK7) cuando se coexpresan en sistemas recombinantes o cuando están presentes en neuronas (Hoo y cols., 1999). Se ha descrito que los receptores a Kainato pueden también actuar como receptores metabotrópicos en el hipocampo (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998).

El segundo grupo está compuesto por los receptores metabotrópicos al glutamato que a diferencia de los ionotrópicos están acoplados a sistemas de segundos mensajeros. Están dividido en tres subgrupos que se encuentran representados en la tabla 1.1 (Pin y Duvoisin, 1995):

TABLA 1.1. TIPOS DE RECEPTORES METABOTROPICOS AL GLUTAMATO.

Tipo	mGluR I	mGluR II	mGluR III
Subtipos	mGluR1 mGluR5	mGluR2 mGluR3	mGluR4, mGluR6 mGluR7
Activación (agonista principal)	,5-dihydroxifenilglicina (DHPG) (Schoepp y cols., 1994)	2-(2,3-dicarboxyciclopropil)glicina (DCG-IV) (Kamiya y cols., 1996)	2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4) (Hayashi y cols., 1993)
Cadena de segundos mensajeros	Incremento de la fosfolipasa C	Decremento de la adenilato ciclasa.	Decremento de la adenilato ciclasa.

Presencia de los receptores al glutamato en el hipocampo.

Los receptores NMDA, AMPA y kainato se encuentran en las dendritas apicales proximales de las células piramidales (Represa y cols., 1987; Malva y cols., 1998) y en interneuronas (Koh y cols., 1995). En las células piramidales de CA3 existen pocos receptores sensibles a NMDA (Monaghan y Cotman, 1985).

En cuanto a los receptores AMPA las células piramidales expresan la subunidad GluR2 de los receptores AMPA y las interneuronas expresan la GluR4 (Jonas y cols., 1994; Geiger y cols., 1995; Toth y cols., 2000). La ausencia de GluR2 en interneuronas produce un incremento significativo en la permeabilidad al Ca^{++} (McBain y cols., 1999).

Durante el desarrollo los receptores AMPA se expresan más tardíamente que los receptores NMDA. Estos últimos, en este periodo, tiene un rol de mantenimiento de las sinaptogénesis durante el desarrollo (Swann y cols., 1990).

La activación de receptores a Kainato facilita o deprime la liberación de glutamato (Kullmann, 2001). Está reportado que hay receptores presinápticos a kainato (KAR) en las colaterales de Schaffer, en las FM y en la vía asociativa/comisural

que viene del séptum (Represa y cols., 1987; Schmitz y cols., 2001) y su activación deprime la transmisión sináptica de estas vías (Vignes y Collingridge, 1997; Kamiya y Ozawa, 1999; Bortolotto y cols., 1999). Estos receptores actúan como receptores metabotrópicos (Lerma, 2003). Por otro lado reportes recientes indican que en las sinapsis entre las FM y las interneuronas la activación de los receptores al kainato presinápticos facilita la liberación de glutamato de manera independiente de PKC (Lauri y cols., 2005) al igual que en la vía perforante (Contractor y cols., 2000). Durante la primera semana del desarrollo el L-glutamato endógeno activa a los receptores al kainato y regula la liberación de glutamato (Lauri y cols., 2005).

La activación de los receptores metabotrópicos al glutamato (mGluR) tiene funciones moduladoras de la excitabilidad de la neurona (Pin y Duvoisin, 1995). Los receptores mGluR (tipo II y III) se localizan presinápticamente en las fibras musgosas y su activación reduce la liberación de glutamato probablemente por la reducción de corrientes de Ca^{++} dependientes de voltaje (Kamiya y Ozawa, 1999). Postsinápticamente se localizan en interneuronas y células piramidales de CA3 (mGluR1)(Kamiya y cols., 1996; Kamiya y Ozawa, 1999) y de CA1 (mGluR5) (Shigemoto y cols., 1997).

GABA (ácido gamma amino butírico).

El GABA es un neurotransmisor inhibitor aunque en ciertas circunstancias puede tener una acción despolarizante (Ben Ari y Holmes, 2005). Casi todas las interneuronas en el hipocampo son GABAérgicas y equivalen al 10% de la población neuronal total de la formación hipocampal (Freund y Antal, 1988; Freund

y Buzsaki, 1996; Freund y Gulyas, 1997).

Síntesis.

El GABA se sintetiza a partir de glutamato por acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y utiliza al fosfato de piridoxal como cofactor (fig. 1.4).

La GAD se presenta en dos isoformas que difieren en su peso molecular (GAD₆₅ y GAD₆₇) secuencia, localización y expresión (Erlander y cols., 1991).

Se ha propuesto que la primera, la GAD₆₅, se localiza en las terminales axónicas y está involucrada en la síntesis y liberación de GABA vesicular. La GAD₆₇, se encuentra en el citoplasma e interviene en la síntesis de GABA no vesicular (Soghomonian y Martin, 1998; Battaglioli y cols., 2003). Durante el desarrollo se expresa el mRNA para la GAD₆₇ en las FM y posteriormente, en la edad adulta, esta proteína disminuye (Maqueda y cols., 2003).

Receptores.

Se han descrito dos diferentes tipos de receptores a GABA en el hipocampo (Naik y cols., 1976): ionotrópicos (GABA_A) y metabotrópicos (GABA_B y GABA_C). Los primeros son pentámeros formados por diferentes tipos de subunidades: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ y π (Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart y Sperk, 2002). Tienen canales permeables a Cl⁻ y producen un potencial postsináptico inhibitor rápido que es bloqueado por bicuculina y picrotoxina. El segundo grupo actúa a través de proteínas G que abren canales de K⁺ y producen un potencial postsináptico inhibitor lento que es bloqueado por baclofén y aza-THIP (Soltesz y cols., 1988).

Presencia de los receptores al GABA en el hipocampo.

Los receptores GABA_A están localizados en el soma y en las dendritas de las células piramidales (Nusser y cols., 1996) y los receptores GABA_B están localizados en el dendritas de estas mismas células y en las terminales axónicas de las fibras musgosas y colaterales de Schaffer (Lopez-Bendito y cols., 2004).

Durante la primera semana de vida de las ratas el GABA tiene un efecto despolarizante debido a que la concentración de Cl⁻ intracelular es mayor. Como los receptores AMPA no se han expresado en esta edad y es necesaria la despolarización de la célula para liberar el Mg⁺⁺ de los receptores a NMDA se ha sugerido que la activación de los receptores GABA_A proveen la despolarización necesaria (Ben Ari y cols., 1994; Ben Ari y cols., 1997).

Existen, además, receptores GABA_A extrasinápticos que son responsables de la inhibición tónica (Mody, 2005). Su composición es diferente a los que subyacen a la inhibición fásica ($\alpha 6\beta 2/3\delta$) (Nusser y cols., 1998). No son sensibles a benzodiazepinas.

Acetilcolina (ACh).

Su acción en el hipocampo es excitadora. La liberación de acetilcolina (ACh) en el hipocampo proviene de proyecciones septales y de interneuronas colinérgicas restringidas al hilus (Amaral y Kurz, 1985; Blaker y cols., 1988; Linke y cols., 1994; Dutar y cols., 1995; Frotscher y cols., 2000).

Síntesis.

La síntesis se lleva a cabo en una sola reacción enzimática a partir de la acetil coenzima A y la colina para producir acetilcolina y coenzima A. La enzima que lleva a cabo la reacción es la Colin acetil transferasa (ChAT) (Woolf, 1991).

Receptores.

Los receptores para la acetilcolina se dividen en: ionotrópicos y metabotrópicos. Por su respuesta a dos tipos de alcaloides se les denomina nicotínicos (nicotina) y muscarínicos (muscarina) respectivamente.

a) Los receptores nicotínicos son proteínas pentaméricas compuestas por 2 a 4 subunidades y múltiples regiones que se ubican alrededor de un canal interno (Turek y cols., 1995). Este canal permite el paso de cationes. Las subunidades determinan las características del receptor y las propiedades de afinidad a determinados ligandos. Producen respuestas farmacológicas y fisiológicas de corta latencia, corta duración y despolarizantes. Se han descrito dos tipos de receptores nicotínicos: el tipo muscular y el tipo neuronal. El tipo muscular posee 4 subunidades distintas (2 α , 1 γ , 1 β y 1 δ). El tipo neuronal se subdivide en dos tipos en el sistema nervioso central: aquellos sensibles a α -Bungarotoxina y los insensibles a α -Bungarotoxina. El tipo neuronal contiene 2 subunidades (2 α , y 3 β).

b) Los receptores muscarínicos son del tipo metabotrópico y son el tipo más importante de receptores colinérgicos en el sistema nervioso central (Caulfield, 1993). Son proteínas que se componen de 7 dominios transmembranales. Están

acoplados a proteínas G y a través de éstas el ligando activa una serie de procesos intracelulares como el incremento de los niveles de GMP cíclico, decremento de los niveles de AMP cíclico y el incremento del recambio de fosfolípidos membranales. Se conocen cinco genes (m1-m5) que codifican para los cinco tipos de receptores M1-M5 (Levey y cols., 1995b) (tabla 1.2.)

Tabla 1.2. TIPOS DE RECEPTORES MUSCARINICOS.

NOMBRE	M1	M2	M3	M4	M5 H neuroblastoma A2058
Agonista selectivo	McN-A343 (ganglio) Pilocarpina (relativo a M3 y M5) L-689,660 MT1	Betanecol (relativo a M4)	L-689,660	McN-A343 (relative to M2)	
Antagonista selectivo	Pirenzepina Telenzepina 4-DAMP MT7	Pirenzepina (cardiaco) Metoctramina AF-DX-116 Galamina(no-competitivo) Himbacina	Pirenzepina (glandular M2) Hexahidro-siladifenidol ρ -Fluorohexahidrosiladifenol 4-DAMP MT1	Tropicamida Himbacina 4-DAMP MT3	4-DAMP
Mecanismo de transducción de señal	IP3/DAG	cAMP	IP3/DAG	cAMP	IP3/DAG
Distribución Periferia	Glándulas	Corazón	Tejido Glandular	Pulmón	
Cerebro	Corteza Cerebral Hipocampo	Músculo Liso Cerebelo Cerebro medio	Músculo Liso Telencéfalo Núcleo Talámico Cerebro medio	Corteza Cerebral Estriado	Sustancia nigra (dopamina)

Presencia de los receptores a ACh en el hipocampo.

Los receptores nicotínicos se localizan en interneuronas de CA1 (McQuiston y Madison, 1999b), en interneuronas del giro dentado, interneuronas del hilus y en células musgosas (Frazier y cols., 2003); en células piramidales (Swanson y cols., 1987). La subunidad $\alpha 7$ se localiza a nivel pre, post y extrasináptico, tanto en las

vías glutamatérgicas como en las GABAérgicas (Fabian-Fine y cols., 2001) esto demuestra que tanto las fibras glutamatérgicas como las GABAérgicas son afectadas directamente por la ACh.

Los receptores muscarínicos se localizan tanto presináptica como postsinápticamente. Postsinápticamente se localizan en el soma y en las dendritas apicales de células piramidales (M1) y células granulares (M1 y M3) (Levey y cols., 1995c). Modulan la transmisión excitadora de células piramidales en el hipocampo. La entrada colinérgica llamada vía asociativa/comisural (A/C) modula directamente a la células piramidales de CA1 y, de manera indirecta a las células piramidales de CA3 a través de la activación de interneuronas (Vogt y Regehr, 2001). Esta misma vía colinérgica (A/C) genera oscilaciones theta en el hipocampo (Bragin y cols., 1995; Whittington y cols., 1995; Purves y cols., 2001; Wu y cols., 2004).

Presinápticamente los receptores del tipo M2 se localizan en la vía septohipocampal (Levey y cols., 1995d; Rouse y Levey, 1996; Rouse y Levey, 1997; Rouse y cols., 1999) y su estimulación disminuye la liberación de neurotransmisor (Lapchak y cols., 1989). Este subtipo deprime las respuestas inhibitoras y excitadoras tanto de células piramidales como de interneuronas (Valentino y Dingledine, 1981; Krnjevic, 1993). También se ha descrito receptores muscarínicos presinápticos (M2 y M4) en axones no colinérgicos (Levey y cols., 1995a).

La activación de receptores muscarínicos deprime la transmisión glutamatérgica en estructuras corticales (Hasselmo y Fehlau, 2001), colaterales de Schaffer (Hasselmo y Schnell, 1994) y fibras musgosas (Hasselmo y cols., 1995).

El gen m1, que codifica este tipo de receptor muscarínico, se expresa en los somas y dendritas de las células piramidales y células granulares. El m2 se expresa en células no piramidales. El gen m3 se expresa en células no piramidales, vías en el alveus, fimbria y comisura y en el primer tercio de la capa molecular (Levey y cols., 1995a).

CAPITULO 2

PROYECCION DEL GIRO DENTADO A CA3

Los axones de las células granulares, las fibras musgosas, hacen contactos sinápticos con las interneuronas y células piramidales de CA3 y con las células musgosas, en el *hilus*. (Frotscher, 1985; Frotscher y cols., 1988; Lubke y cols., 1998). Las fibras musgosas (FM) liberan glutamato y excitan a todos estos tipos celulares. Las FM excitan a las dendritas proximales de las células piramidales y a las dendritas apicales de las interneuronas inhibitoras locales (Acsady y cols., 1998). Estas interneuronas GABAérgicas, a su vez, hacen sinapsis con las células piramidales (Andersen y cols., 1963; Amaral, 1979; Frotscher, 1985; Frotscher y cols., 1988; Frotscher y cols., 1994; Miles y cols., 1996) por lo que, al ser activadas por las FM, inhiben a las células piramidales. Este arreglo sináptico (Fig. 2.1) permite la inhibición proactiva disináptica (feed-forward inhibition).

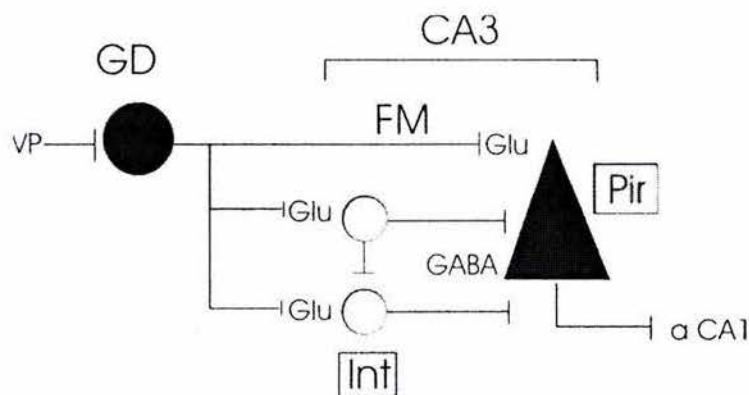


Figura 2.1. Esquema del arreglo sináptico de la región CA3 donde se muestran los contactos mono- y polisinápticos. Abreviaturas: Int, interneuronas; Pir, piramidal; VP, vía perforante; FM fibras musgosas; Glu, glutamato (modificado de: Romo-Parra y cols., 2003).

Las FM tienen propiedades morfológicas, farmacológicas y fisiológicas exclusivas y características (Gaarskjaer, 1986; Henze y cols., 2000).

La ultraestructura de las FM ha sido ampliamente estudiada en ratas (Blackstad y Kjaerheim.A., 1961; Laatsch y Cowan, 1966; Amaral y Dent, 1981), conejos (Hamlyn, 1961; Hamlyn, 1962; Hamlyn.L.H., 1963), cobayos (Blackstad y Flood, 1963), ratones (LaVail y Wolf, 1973), gatos (Tombol y cols., 1978) y en el humano (Nadler, 2003).

Las FM son axones no mielinizados con un diámetro de 0.1-0.7 μm . Tienen grandes expansiones sinápticas (botones gigantes) (Blackstad y Kjaerheim.A., 1961; Amaral y Dent, 1981). Estos botones gigantes hacen contacto con las dendritas proximales de las células piramidales (Blackstad y Kjaerheim.A., 1961; Amaral y Dent, 1981; Acsady y cols., 2000); con interneuronas de la región CA3 y con células musgosas del hilus (West y cols., 1982).

Las terminaciones de estos axones, se pueden clasificar en tres tipos: 1) botones gigantes 2) terminaciones *en passant* y 3) extensiones filopoidales (Cajal, 1911; Blackstad y Kjaerheim.A., 1961; Amaral, 1979; Claiborne y cols., 1986; Chicurel y Harris, 1992; Acsady y cols., 1998) y cada terminación tiene como blanco un tipo celular diferente (Acsady y cols., 1998).

- Botones gigantes. Miden entre 4 y 10 μm de diámetro y su área promedio es de $11\mu\text{m}^2$. (Amaral, 1979; Amaral y Dent, 1981; Gaarskjaer y cols., 1982). Los botones están invaginados por las espinas de las dendritas proximales de las células piramidales (Henze y cols., 2000). En las células musgosas

del hilus hacen sinapsis con las dendritas proximales (Amaral y Dent, 1981; Acsady y cols., 1998). Cada botón tiene múltiples contactos sinápticos asimétricos (aproximadamente 25-31 contactos) con las espinas gigantes (Chicurel y Harris, 1992; Acsady y cols., 1998). Las terminales contienen numerosas vesículas claras (20-60 nm de diámetro); algunas vesículas de centro electro-denso (60-150 nm de diámetro) y entre 6 y 12 mitocondrias periféricas (Gaarskjaer, 1985). Cada botón contiene microtúbulos de retículo endoplásmico liso. Otro tipo de contacto de los botones gigantes es la *puncta adherentia* (Hamlyn, 1962; Amaral y Dent, 1981) los cuales se presentan entre los botones gigantes y los troncos dendríticos. Miden entre 0.1-0.5 μm y no tienen vesículas asociadas.

- Extensiones filopoidales. Están asociadas con interneuronas del hilus e interneuronas locales de la región CA3. Son terminaciones más pequeñas (0.5 a 2.0 μm de diámetro) que se extienden de los botones gigantes y no forman múltiples sitios de liberación (Cajal, 1911; Amaral y Dent, 1981; Acsady y cols., 1998). Más de 9 extensiones filopoidales proceden del cuerpo principal de cada botón gigante que puede extenderse por más de 30 μm (Amaral, 1978; Amaral, 1979) y cada célula granular tiene entre 25 y 35 extensiones filopoidales. El tamaño de estas extensiones varía durante el desarrollo (vgr. son más largas en ratas con dos semanas que en ratas con cuatro semanas de edad).
- Terminales en *passant*. Son botones de tamaño pequeño (0.5 a 1.5 μm de diámetro) y se observan como una protuberancia fusiforme del axón

principal. Inervan de forma preferente a las interneuronas del *stratum lucidum* de CA3. Cada célula granular puede tener entre 12 y 17 terminales en *passant* con la región CA3 (Acsady y cols., 1998)

Las fibras musgosas forman más contactos con las interneuronas (40-50 contactos) que con células piramidales (11-18 contactos) (Acsady y cols., 1998).

Fisiología de las fibras musgosas.

La respuesta de una célula piramidal de la región CA3 a la estimulación del giro dentado consta de un potencial postsináptico excitador (EPSP por sus siglas en inglés), seguido de un potencial postsináptico inhibitor rápido (IPSP; GABA_A), y uno lento (GABA_B) (Lawrence y McBain, 2003). En presencia de antagonistas a los receptores ionotrópicos al glutamato, NMDA y no NMDA, la activación de las FM no produce respuesta alguna. El bloqueo de las respuestas GABAérgicas, evocadas por la estimulación de las FM, por antagonistas glutamatérgicos indica que son de naturaleza polisináptica (Dichter y Spencer, 1969a; Dichter y Spencer, 1969b; Yamamoto, 1972; Crawford y Connor, 1972).

Una característica de las FM es que la liberación de glutamato es modulada presinápticamente por la activación de receptores metabotrópicos al glutamato (mGluR) (Manzoni y cols., 1995; Maccaferri y cols., 1998) y esto es una prueba indiscutible de que las respuestas sinápticas tienen como origen las fibras musgosas (Manzoni y cols., 1995; Tong y cols., 1996; Min y cols., 1998b). La transmisión glutamatérgica en la rata es modulada por la activación de receptores metabotrópicos al glutamato del grupo II (DCG-IV) pero no por la activación del

grupo III. Por otro lado, en el cobayo, la activación de los receptores metabotrópicos al glutamato del grupo III modula la liberación de glutamato de las fibras musgosas (Lanthorn y cols., 1984; Ohishi y cols., 1993; Ohishi y cols., 1995; Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997). Se ha demostrado que las respuestas GABAérgicas que tienen su origen en las FM en la rata son parcialmente inhibidas por la activación de mGluR del grupo II (ver resultados), mientras que la activación de mGluR del grupo III las inhibe casi por completo (Gutierrez, 2000; Gutierrez, 2002; Romo-Parra y cols., 2003). En apoyo a este hallazgo, se ha descrito que las células granulares y sus axones, en la rata, expresan mRNA para los mGluR de los grupos II y III (Ohishi y cols., 1993; Ohishi y cols., 1995) y mGluR 2,4,7 (Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Lie y cols., 2000). Esto permite proponer un mecanismo de control presináptico selectivo para el tipo de neurotransmisor que se libera de las FM (Gutierrez, 2002).

Las FM se caracterizan por tener alta susceptibilidad a cambios plásticos. Un fenómeno plástico es el conocido como potenciación a largo plazo (LTP) que se define como el incremento sostenido de la transmisión sináptica producido por la activación tetánica de las células presinápticas (Friedlander y cols., 1990). Se han descrito dos tipos de LTP en el hipocampo: presináptico y postsináptico (Zalutsky y Nicoll, 1990). En la sinapsis FM-CA3 la LTP es un fenómeno presináptico (Xiang y cols., 1994; Weisskopf y Nicoll, 1995; Maccaferri y cols., 1998; Vogt y Nicoll, 1999), independiente de receptores NMDA (Zalutsky y Nicoll, 1990; Zalutsky y Nicoll, 1992) y dependiente de la presencia y aumento de Ca^{++} en la presinapsis (Zalutsky y Nicoll, 1990; Zalutsky y Nicoll, 1992) con un consecuente incremento

en la probabilidad de liberación del neurotransmisor. La estimulación tetánica de las FM induce potenciación a largo plazo en las células piramidales pero no afecta o induce depresión en las interneuronas (Maccaferri y cols., 1998). Los mecanismos subyacentes son aún desconocidos pero se puede suponer que algún componente esencial en la cascada dependiente de cAMP se encuentra ausente en las terminales que hacen contacto con las interneuronas y no en las células piramidales (McBain y cols., 1999).

Hipótesis de que las fibras musgosas liberan GABA además de glutamato.

Como se describió anteriormente la activación de las FM produce respuestas excitadoras monosinápticas e inhibitoras polisinápticas en células piramidales de CA3. El bloqueo de la transmisión glutamatérgica previene tanto las respuestas excitadoras como las inhibitoras.

Sin embargo, después de inducir un estado epiléptico con crisis convulsivas generalizadas por el método de "kindling" (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001), la estimulación del GD produce respuestas monosinápticas inhibitoras, en presencia de antagonistas a los receptores ionotrópicos a glutamato. Esta respuesta se bloquea con el antagonista de los receptores GABA_A (Bicuculina) lo que demuestra su naturaleza GABAérgica. Este IPSP tiene la misma latencia que el EPSP glutamatérgico control y puede ser inhibido por la activación de mGluR-III. Este potencial GABAérgico es una respuesta transitoria puesto que aunque se observa 24 horas después de la última crisis convulsiva no está presente en los registros que se realizan un mes después. Sin embargo, si después de este mes sin estímulo, se inducen nuevamente crisis, el IPSP

reaparece (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001). Este potencial GABAérgico se deprime con la perfusión de una solución baja en Ca^{++} y con la activación de receptores metabotrópicos al GABA_B sin modificar su latencia ni su pendiente (Gutierrez, 2000). Estos datos sugieren que el IPSP es una respuesta monosináptica debido a que, bajo estas condiciones, la probabilidad de reclutar interneuronas que evoquen esta respuesta es casi nula. Esta respuesta tampoco se debe a la activación de sinapsis eléctricas (Gutierrez, 2000).

En preparaciones de animales con crisis convulsivas únicas también es posible evocar el IPSP monosináptico por lo que no es necesario un estado de actividad epileptiforme para inducir cotransmisión.

Existe evidencia de que el kindling induce crecimiento y ramificación de las fibras musgosas (Cavazos y cols., 1991; Babb y cols., 1991; Qiao y Noebels, 1993) y de interneuronas inhibitoras (Davenport y cols., 1990), sin embargo, una sola crisis no es capaz de producir esta ramificación (Cavazos y cols., 1991). Por lo tanto el IPSP no es producto de la ramificación de interneuronas GABAérgicas.

La inducción de un estado de hiperexcitabilidad por activación sináptica o directa de las células granulares *in vitro* mediante un protocolo tipo LTP también provoca el IPSP monosináptico (Gutierrez, 2002). Así cuando las respuestas mono y polisinápticas control de una célula piramidal son bloqueadas y se induce hiperexcitabilidad *in vitro* en está misma célula se evocan respuestas inhibitoras monosinápticas (Gutierrez, 2002). Esto establece que solamente es necesario un cierto nivel de excitación de las células granulares para expresar un fenotipo GABAérgico.

Se ha demostrado que la activación de las FM es capaz de provocar respuestas monosinápticas inhibitoras en células piramidales de la región CA3 en preparaciones de hipocampo de cobayos jóvenes independientes de incremento de actividad (Walker y cols., 2001; Bergersen y cols., 2003). Estas respuestas tienen las mismas propiedades plásticas y farmacológicas que las reportadas para la transmisión glutamatergica procedente de las fibras musgosas. Se descarta, a su vez, la posibilidad de que la señal GABAérgica tenga un origen diferente al de la señal glutamatergica además de que ambos neurotransmisores pueden liberarse sincrónica o asincrónicamente. Además, se observó que por estimulación mínima es posible evocar componentes glutamatergicos, GABAérgicos o ambos simultáneos (Walker y cols., 2001), lo que demuestra, junto con otros estudios (Lamas y cols., 2001), que estos neurotransmisores son liberados de diferentes vesículas.

Sandler y Smith (1991) reportaron la presencia de inmunoreactividad (IR) al GABA en las terminales de las FM pero no en los somas en tejido de hipocampo de monos y humanos. En este estudio no se encontró IR a la GAD, por lo que se propuso que el GABA provenía del espacio extracelular o se sintetizaba a partir del γ -hidroxibutirato. En sinaptosomas de FM se mostró que las terminales contenían GABA (Terrian y cols., 1988; Taupin y cols., 1994a; Taupin y cols., 1994b). Posteriormente se reportó que las células granulares de ratas, monos y humanos epilépticos, contienen GAD (Sandler y Smith, 1991; Sloviter y cols., 1996) además de GABA. Además la expresión de la GAD y de GABA es transitoria después de la presencia de crisis convulsivas (Schwarzer y Sperk, 1995; Sloviter y

cols., 1996; Lehman y Horton, 1996). Se ha determinado que la expresión de la respuesta inhibitoria aberrante coincide con la sobre expresión de GAD en el giro dentado y de GABA endógeno en terminales de FM de manera dependiente de la excitabilidad (Ramirez y Gutierrez, 2001; Gomez-Lira y cols., 2002). Se sabe que tanto las células granulares como las interneuronas del hipocampo contienen mRNA para la GAD (Cao y cols., 1996).

Para que una célula pueda liberar GABA el aminoácido tiene que ser transportado hacia las vesículas sinápticas. Por técnicas de inmunohistoquímica no se encontró IR para el transportador vesicular de GABA (VGAT) en las FM de animales sanos (McIntire y cols., 1997; Chaudhry y cols., 1998). Sin embargo, recientemente Lamas y col. (2001) demostraron que las células granulares y sus FM contienen y expresan el mRNA para el transportador vesicular de GABA de manera dependiente de actividad (Lamas y cols., 2001).

Está reportado que el transportador membranal al GABA (GAT-1) puede alterarse después de epilepsia (During y cols., 1995). Por lo que la liberación de GABA puede presentarse a través de este transportador y no ser del tipo vesicular. Recientemente se demostró que la respuesta GABAérgica monosináptica rápida de las células piramidales a la activación del giro dentado no depende de la inversión en la dirección del transportador de GABA (GAT-1 y/o GAT-3). Sin embargo, el bloqueo del transportador GAT-1 GABA incrementa la amplitud del IPSP procedente de las FM (Vivar y Gutierrez, 2005). Otros datos que apoyan la liberación vesiculada de GABA de las FM son que en sinaptosomas de FM la recaptura de GABA y su ulterior liberación evocada no se modifica después de kindling (Gomez-Lira y cols., 2002).

Todas las evidencias mencionadas hasta el momento apoyan la hipótesis de que las fibras musgosas son capaces de liberar GABA además de glutamato como respuesta a un incremento de excitabilidad del sistema.

CAPITULO 3

SISTEMA COLINERGICO EN EL HIPOCAMPO

La información cortical ingresa al hipocampo a través de la vía perforante la cual forma sinapsis excitadoras con las células granulares e interneuronas GABAérgicas. Las células granulares proveen la mayor entrada excitadora a la región CA3 y las interneuronas regulan la excitabilidad en el sistema. Tanto las células granulares como las interneuronas, están moduladas por vías colinérgicas procedentes del séptum (Frotscher y Leranth, 1985). Dicha modulación tiene un rol sumamente importante en la memoria y en la epilepsia (Scoville y Milner, 1957; Winson, 1978; Blitzer y cols., 1990; Squire, 1998).

Proyección septo-hipocampal.

El séptum.

Cajal (1911) describió anatómicamente al séptum como una parte de los ganglios basales, contrariamente a la idea de que era una región especializada de la corteza cerebral. Actualmente se define al séptum como una estación de relevo entre el diencefalo y el telencefalo.

El complejo septal está dividido en tres partes: El séptum medio/Banda diagonal de Broca (MS/DB), el séptum lateral (LS) y el séptum posterior (PS).

Los dos subnúcleos del MS/DB son el núcleo del medio septal (MS) y el núcleo de la banda diagonal de Broca (DB). Este último está compuesto por el miembro horizontal (hDB) y el miembro vertical (vDB). El séptum medio y la banda diagonal de Broca a menudo se clasifican como dos núcleos separados aunque ellos son realmente un continuo sin frontera anatómica entre ellos (Fig. 3.1). Las células de MSvDB proyectan principalmente al hipocampo, a la corteza entorrinal y a la corteza del cíngulo (Gaykema y cols., 1990). Aproximadamente del 40 al 50% de las células son colinérgicas y del 10 al 20% GABAérgicas (Linke y cols., 1994). Las células colinérgicas y GABAérgicas de MS/vDB son consideradas las vías externas más importantes al hipocampo (Lee y cols., 1994; Wenk y cols., 1994).

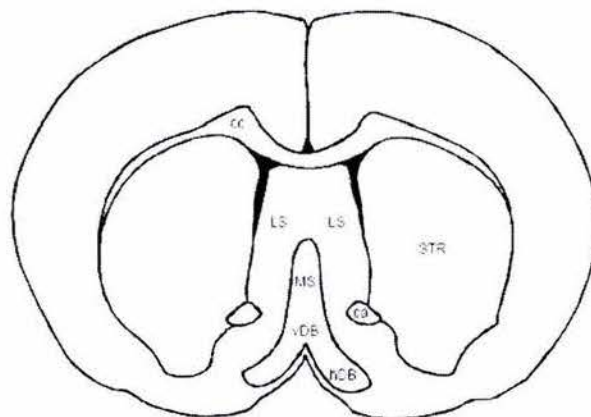


Figura 3.1. Esquema de un corte coronal de un cerebro de rata donde se muestran las regiones del séptum. Abreviaturas: MS séptum medio; LS = séptum lateral vDB = Banda diagonal de Broca vertical; hDB = Banda diagonal de Broca horizontal; STR= estriado; ca = comisura anterior; cc = cuerpo caloso. (Paxinos y cols., 1980).

Interconexiones entre séptum e hipocampo.

Las conexiones entre el séptum y el hipocampo son recíprocas. Las vías ascendentes al hipocampo provienen del séptum medio y de la banda diagonal de Broca, proyectan hacia el fórnix y la vía perforante y a través de la vía comisural llegan al hipocampo (Amaral y Kurz, 1985; Gaykema y cols., 1990). Estas fibras se

encuentran en todas las capas de la formación hipocampal y hacen contacto directo con células piramidales, células granulares e interneuronas locales (Frotscher y Leranth, 1985; Leranth y Frotscher, 1987). Las conexiones que surgen del séptum y llegan al hipocampo son colinérgicas y GABAérgicas. La gran mayoría (alrededor del 90%) de la inervación colinérgica del hipocampo proviene de MSvDB (Wainer y cols., 1984). Las proyecciones GABAérgicas septales hacen contactos selectivos con las interneuronas GABAérgicas del hipocampo y proveen de desinhibición indirecta a las células piramidales en toda la formación hipocampal (Freund y Antal, 1988). Por otro lado, las terminales colinérgicas hacen sinapsis con interneuronas GABAérgicas tanto en CA3 (Wainer y cols., 1984; Frotscher y Leranth, 1985; Leranth y Frotscher, 1987; Vogt y Regehr, 2001) como en CA1 (Pitler y Alger, 1992) por lo que la entrada colinérgica al hipocampo modula, a través de la activación de interneuronas GABAérgicas, la excitación glutamatérgica de células piramidales y células granulares (Vogt y Regehr, 2001). Se ha descrito que la aplicación de un agonista colinérgico deprime los IPSP GABAérgicos evocados en las células piramidales (Krnjevic y Ropert, 1981; Krnjevic y cols., 1981; Krnjevic, 1981a; Krnjevic, 1981b; Krnjevic, 1981c). Estas vías septo-hipocampales modulan los ritmos de la formación hipocampal (Chrobak y cols., 2000). Hay otra vía septohipocampal que corre ventralmente y pasa a través de la amígdala (Milner y Amaral, 1984) esta ruta contiene proyecciones noradrenérgicas y serotoninérgicas.

La activación de receptores NMDA en el séptum activa tónicamente células GABAérgicas septales que a su vez inhiben a las neuronas colinérgicas septohipocampales (Giovannini y cols., 1994).

Las conexiones del hipocampo al séptum se originan en las células piramidales de CA1 y CA3, las primeras proyectan a todo el séptum lateral mientras que las células piramidales de CA3 únicamente se dirigen a la región caudal de éste (Szeidemann y cols., 1995; Jakab y Leranth, 1995). Existen también conexiones entre interneuronas del hipocampo con el séptum medio y la banda diagonal de Broca. Esta proyección hace contacto tanto en células colinérgicas como en células GABAérgicas del séptum (Szeidemann y cols., 1995; Jakab y Leranth, 1995).

Recientemente se reportó la existencia de dos poblaciones distintas de neuronas colinérgicas en el séptum medio (Nyiri y cols., 2005). El primer tipo expresa receptores GABAb 1a/b y receptores canabinóides CB1. A diferencia del segundo tipo, estas neuronas proyectan al hipocampo y sus somas son más grandes que las neuronas colinérgicas que no expresan receptores GABAb 1a/b.

Modulación colinérgica en el hipocampo.

El séptum medio y la Banda diagonal de Broca contienen células GABAérgicas y colinérgicas y estas hacen contactos sinápticos con el hipocampo (Stewart y Fox, 1990). Sin embargo recientemente se reportó que existen células, en el séptum, con mRNA que codifica para los de transportadores vesiculares para el glutamato (VGLUT1 y VGLUT2) y no para la ChAT ni GAD₆₇ (Sotty y cols., 2003). Estas neuronas glutamatérgicas presentan características electrofisiológicas similares a las células septales colinérgicas.

La aplicación de agonistas colinérgicos tienen diferentes efectos en el hipocampo como la inducción de ráfagas y oscilaciones (Bianchi y Wong, 1994) y la

modulación de la plasticidad sináptica (Feig y Lipton, 1993). El carbacol, un agonista colinérgico, produce dos oscilaciones espontáneas distintas en neuronas de CA3 del hipocampo de rata: a) concentraciones 4-13 μM produce descargas de 0.5-2 Hz (δ) y b) concentraciones altas de carbacol (13-60 μM) producen episodios cortos de 5-10 Hz (θ) (Fellous y Sejnowski, 2000).

La liberación de acetilcolina y la activación de los receptores muscarínicos juega un papel muy importante en el hipocampo (Levey y cols., 1991; Hajos y cols., 1998a; Rouse y cols., 1999). Estos receptores modulan varias conductancias en las células piramidales. Conductancias a K^+ (I_M , la corriente de K^+ sensible a muscarina; I_{AHP} , la corriente de K^+ activada por Ca^{++} responsable de disminuir la frecuencia de disparo; I_{leak} , corriente de fuga; I_A , corriente transitoria rápida dependiente de voltaje). A la vez la activación de receptores muscarínicos potencian dos corriente catiónicas (I_H , corriente activada por hiperpolarización; I_{CAT} , corriente catiónica no específica dependiente de Ca^{++}) (Halliwell, 1990; Colino y Halliwell, 1993) y modulan la actividad de ambas corrientes de Ca^{++} dependientes de voltaje (Toselli y cols., 1989).

Con respecto a la modulación de las conductancias de K^+ la reducción de estas da como consecuencia los siguientes efectos: 1) despolarización, 2) incremento o facilitación de la potenciación a largo plazo, 3) y supresión de la adaptación neuronal. El incremento de la LTP es mediado por receptores del tipo M1 (Blitzer y cols., 1990; Burgard y Sarvey, 1990). La acetilcolina deprime corrientes de Ca^{++} (Dutar y cols., 1995; Marrion, 1997) por lo que la inhibición presináptica está relacionada con una inhibición de las corrientes de Ca^{++} por la activación de

receptores muscarínicos (Qian y Saggau, 1997). Los agonistas muscarínicos (vgr. metrifonato) y los bloqueadores de canales de potasio dependientes de calcio (tipo SK; vgr. apamina) disminuyen la hiperpolarización del postpotencial medio (mAHP) (Dutar y cols., 1995; Marrion, 1997). Las corriente IM y IAHP suprimen la adaptación de disparo (Madison y Nicoll, 1984). La despolarización está asociada con incremento de la resistencia membranal y con corrientes de acople dependientes de voltaje (Benardo y Prince, 1982). La activación de mAChRs modula también varios receptores dependientes de ligando incluidos los receptores NMDA al potenciar las respuestas para L-glutamato pero no para el kaianato ni el quisquilato (Markram y Segal, 1990).

En general la aplicación de acetilcolina exógena en las células piramidales del hipocampo provoca despolarización pronunciada e incrementa la resistencia de entrada de la célula (R_i) (Cole y Nicoll, 1984a; Cole y Nicoll, 1984b). La estimulación eléctrica de las aferentes colinérgicas en el hipocampo (Cole y Nicoll, 1983; Madison y cols., 1987; Segal, 1988; Pitler y Alger, 1990; Pitler y Alger, 1992; Morton y Davies, 1997) o las del núcleo septal medio (Morton y Davies, 1997) producen despolarizaciones similares a las evocadas por la aplicación de ACh.

Con respecto a las interneuronas, la activación de mAChRs evoca respuestas más complejas que las que se evocan en células piramidales. La activación farmacológica de los mAChRs incrementa directamente la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas (IPSCs por sus siglas en inglés) y al mismo tiempo deprime las IPSCs evocadas monosinápticamente y la frecuencia de los IPSCs miniatura (Behrends y ten Bruggencate, 1993); también produce despolarización e incremento de la resistencia de entrada (R_i) y este

incremento es menor comparado con el que se produce en las células piramidales (Cobb y Davies, 2005). La estimulación de las aferentes septohipocampales produce diferentes respuestas en interneuronas (Ferrigan y cols., 2003) y se pueden clasificar en: a) respuestas hiperpolarizantes, b) respuestas bifásicas (inicio hiperpolarizante seguido de una fase de despolarización), c) oscilaciones lentas en el potencial de membrana, d) ninguna respuesta en términos de potencial de membrana o conductancia (McQuiston y Madison, 1999a).

Hasta la fecha no se ha podido establecer una relación directa entre las respuestas a la activación de los mAChRs y las características biofísicas de los somas y las dendritas de las neuronas (Parra y cols., 1998; McQuiston y Madison, 1999a).

La actividad de las proyecciones septohipocampales es de gran interés por su posible función como marcapasos del hipocampo (Stewart y Fox, 1990). La activación de receptores a acetilcolina induce en el hipocampo varios tipos de oscilaciones *in vitro*: ráfagas de baja frecuencia, oscilaciones theta intermitente (MacVicar y Tse, 1989), oscilaciones beta (Shimono y cols., 2000) y oscilaciones gamma (Fisahn y cols., 1998).

Los patrones electroencefalográficos característicos del hipocampo son el ritmo theta y las ondas agudas y se cree que las neuronas septales juegan un rol esencial en la generación rítmica del patrón theta (Lee y cols., 1994). Se sugiere que la memoria está relacionada con la actividad neural relacionada con este ritmo (Stewart y Fox, 1990) y las oscilaciones del hipocampo tienen relación con el aprendizaje asociativo (Buzsaki, 2002). Hay dos tipos diferentes de patrón theta:

Tipo uno (6-12 Hz) que se activa durante la marcha; y, Tipo II (4-9 Hz) que se activa durante la inmovilidad (Kramis y cols., 1975).

Las lesiones en el área septal eliminan completamente los ritmos theta del hipocampo (Leung y cols., 1994). Por lo tanto el séptum es considerado el marcapasos del ritmo theta del hipocampo. La aplicación directa de agonistas a los receptores muscarínicos (mAChRs) o a los receptores metabotrópicos al glutamato (mGluR) evoca en el hipocampo ritmos theta y gamma, respectivamente (Martin, 2001). Aunque se ha demostrado que la activación de ambos tipos de receptores es capaz de generar oscilaciones gamma (Palhalmi y cols., 2004). La activación de mAChR o mGluR produce oscilaciones theta con características idénticas (Cobb y cols., 2000).

Relación entre el sistema colinérgico y la epilepsia.

La relación entre el sistema colinérgico y la epilepsia ha sido controversial. Experimentos farmacológicos apoyan la hipótesis de que el sistema colinérgico está fuertemente vinculado con la generación de procesos epilépticos ya que la aplicación de agonistas colinérgicos induce (Wasterlain y Jonec, 1983) o incrementa (Rutecki y Yang, 1997) la actividad epiléptica. En modelos genéticos de epilepsia se encontró que el incremento en la transmisión colinérgica suprime las descargas epilépticas y la aplicación de antagonistas muscarínicos aumenta las descargas (Danover y cols., 1993). Además, se sabe que la lesión de proyecciones colinérgicas facilita la inducción del kindling en el hipocampo y la amígdala (Ferencz y cols., 2000) y modula, a su vez, la actividad epiléptica en el

hipocampo (Ferencz y cols., 2001). La actividad epiléptica incrementa la liberación de acetilcolina en el hipocampo (Serra y cols., 1997a; Serra y cols., 1997b).

Muchos estudios describen la importancia del sistema colinérgico en funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria, y como se mencionó previamente, algunas drogas que incrementan la transmisión colinérgica en el sistema nervioso central son utilizadas en la actualidad, para el tratamiento de trastornos como el Alzheimer. El grado de deterioro mostrado en pacientes con Alzheimer está correlacionado con el grado de disfunción del sistema colinérgico (Perry y cols., 1978; Palmer, 1996), asimismo el daño en las entradas colinérgicas al hipocampo bloquean la memoria espacial (Winson, 1978).

CAPITULO 4

JUSTIFICACION

En el presente trabajo de tesis se plantean dos problemas:

Planteamiento del Problema I.

Evidencia previa muestra que después de crisis convulsivas la estimulación del giro dentado produce simultáneamente respuestas glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas en células piramidales de CA3 (Gutierrez y Heinemann, 2001). Hay evidencia que demuestra que células madre generadas en el giro dentado y que dan origen a las células granulares en el adulto se pueden diferenciar en glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas in vitro (Toda y cols., 2000; Vicario-Abejon y cols., 2000). Por lo tanto el hecho de que las respuestas GABAérgicas y colinérgicas se evoquen por la estimulación del giro dentado en ratas con crisis convulsivas y no en ratas control, permite plantear la siguiente hipótesis:

Hipótesis I.

Las células granulares son el origen de las respuestas glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas. Es decir, que las fibras musgosas son totipotenciales y después de crisis convulsivas pueden liberar los tres neurotransmisores.

Planteamiento del Problema II.

Además de los resultados que apoyan la hipótesis de la liberación de GABA de las fibras musgosas (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001; Gutierrez, 2002) Walker y cols (2001) demostraron que la activación de las fibras musgosas produce respuestas GABAérgicas independientemente de un incremento de la excitabilidad del sistema en cobayos jóvenes en condiciones control. Estos resultados permiten establecer la siguiente hipótesis.

Hipótesis II.

Las respuestas colinérgicas y GABAérgicas producidas por la estimulación de giro dentado se presentan durante el desarrollo, desaparecen en la edad adulta y pueden inducirse nuevamente en respuesta a un estado de incremento de excitabilidad del sistema en ratas.

Para comprobar las hipótesis anteriores se definieron los siguientes objetivos generales y específicos de este trabajo de tesis:

Objetivos para la hipótesis I.

1. Determinar la naturaleza de la respuesta excitadora lenta evocada por la estimulación del giro dentado en preparaciones de ratas con una crisis convulsiva.
 - a) Caracterizar la respuesta excitadora lenta.
 - b) Estudiar sus características farmacológicas.

- c) Caracterizar su modulación presináptica.
- d) Estudiar su influencia sobre el IPSP evocado por la estimulación del giro dentado.
- e) Estudiar la influencia del IPSP evocado por la estimulación del giro dentado en la respuesta excitadora lenta.
- f) Determinar el origen de las respuestas excitadoras lentas evocadas por la estimulación del giro dentado.

Objetivos para la hipótesis II.

- 2. Determinar si la activación de las fibras musgosas produce respuestas dependientes de la activación de receptores colinérgicos y GABAérgicos en células piramidales de CA3 al activar las fibras musgosas en preparaciones de animales en desarrollo.
 - a) Caracterizar las respuestas no glutamatérgicas en ratas de 6, 15 y 25 días de nacidas.
 - b) Determinar el momento de la desaparición de las respuestas colinérgicas y GABAérgicas.
 - c) Caracterizar la modulación presináptica de estas respuestas a diferentes edades.

CAPITULO 5

MATERIAL Y METODOS

Experimentos electrofisiológicos y análisis.

Para los registros electrofisiológicos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar adultas (230-280g) y de 6, 10, 15, 20, 22 y 23 días de edad. Las ratas adultas fueron divididas en dos grupos: control y tratadas con una inyección de pentilinetetrazol (PTZ; Sigma 70mg/kg i.p.), que produjo una crisis convulsiva de 80-120s de duración.

Las ratas fueron anestesiadas con éter y posteriormente decapitadas. Se obtuvieron los cerebros y se depositaron en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) a 4° C que contiene (en mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ y 10 glucosa; pH 7.35. Posteriormente se obtuvieron rebanadas combinadas de hipocampo-corteza entorrinal (400µm) mediante un vibratomo (Campden Instruments, England). Para algunos experimentos, algunas rebanadas de ratas control y con PTZ fueron incubadas en LCRA en presencia de cicloheximida (60µm) o anisomicina (100µm) (Jones y cols., 1992; Otani y cols., 1992) durante dos horas. Posteriormente las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro de interfase aire-líquido y perfundidas con LCRA (a 34°C) constantemente oxigenado (O₂ 95% CO₂ 5%) por una hora antes de iniciar el registro.

Los fármacos utilizados se diluyeron en LCRA: el antagonista a receptores NMDA, ácido (DL)-2-amino-5-fosfonoaléxico (APV; 30 μ M; Tocris), el antagonista a receptores no-NMDA, 6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinolaxina- 2,3-diona (NBQX; 10 μ M; Tocris); el antagonista a receptores GABA_A, bicuculina metiodida (20 μ M; Sigma); el antagonista a receptores GABA_B, CGP55845A (1 μ M; donado por Novartis); los antagonistas colinérgicos M1, pirenzepina (10 μ M; RBI), atropina (50 μ M, Sigma) y la toxina MT7 (100 nM; Peptide Institute); el agonista colinérgico M2 oxotremorina (1 μ M; Sigma); el agonista a receptores metabotrópicos al glutamato del grupo II (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glicina (DCG-IV; 1 μ M; Tocris); el agonista a receptores metabotrópicos al glutamato del grupo III ácido L(+)-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4; 10 μ M; Tocris); y los inhibidores de la síntesis de proteínas, cicloheximida (60 μ M; Sigma) y anisomicina (100 μ M; Sigma).

Se llevaron a cabo registros intracelulares con microelectrodos de borosilicato (70–90 M Ω ; Brown-Flaming Puller) llenos con acetato de potasio 2M (Sigma), mediante un amplificador AxoClamp 2B (Axon Instruments). Se registraron células piramidales de la región CA3a y -b. Las señales fueron adquiridas y analizadas "off-line" mediante el programa pClamp8 (Axon Instruments). La duración de los potenciales de acción y la duración y amplitud de la hiperpolarización postpotencial fueron manualmente medidos como se ha descrito (Scharfman, 1995). La latencia de la respuesta sináptica fue medida desde el inicio del artefacto de estimulación hasta el primer punto de inflexión de la primera derivada del potencial. La resistencia de entrada, tiempo de subida y tiempo al pico de las

respuestas sinápticas fueron medidas con las funciones cursor del programa Clampfit. Estos resultados son expresados con la media \pm E.E. (error estandar). La estimulación eléctrica se realizó mediante un electrodo bipolar de platino ($50\mu\text{m}$) sobre la capa molecular del giro dentado y sobre el stratum radiatum de la región CA3 (Vogt y Regehr, 2001). Las interneuronas locales de la región CA3 se estimularon con una pipeta de borosilicato ($1-2\text{M}\Omega$) llena con LCRA posicionada $200 - 300\mu\text{m}$ de la capa piramidal. La respuestas sinápticas fueron evocadas con pulsos de 0.1 ms y la intensidad utilizada durante el experimento se fijó a aquella que evocara un 75% de la respuesta máxima. El arreglo experimental de registro y estimulación se encuentra esquematizado en la figura 5.1-A.

Experimentos inmunohistoquímicos.

Para el marcaje de las FM se colocó un cristal de Dextran-amina fluoresceína aniónica (MW 3000; Molecular Probes) en la capa granular del GD de rebanadas de animales control y con crisis única. Las rebanadas se mantuvieron perfundidas con LCRA por 5 horas lo que permitió que la Dextran-amina fluoresceína fuera capturada y transportada. Para su fijación las rebanadas se depositaron en un buffer fosfatos (0.1m ; pH 7.4) con paraformaldehído al 4% por 12 horas. Posteriormente se transfirieron a un buffer con sacarosa (30%) por 14h. Después de este proceso las rebanadas se congelaron y se cortaron en un crióstato (Leica, CM 1850) a $14\mu\text{m}$, se montaron con vectashield (Vector) y se cubrieron con gelatina. Algunas rebanadas se marcaron con azul de Evans (Sigma). Los cortes fueron observados y fotografiados bajo un microscopio de epifluorescencia

Axiovert S100 (Zeiss) con filtros para isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Texas Red (Nikon Optiphot-2).

Para el análisis de la inmunoreactividad (IR) de la colín-acetil-transferasa (ChAT), cuatro rebanadas de dos ratas con crisis única y de dos ratas control fueron procesadas después del marcaje fluorescente. Las rebanadas se fijaron en buffer fosfatos (0.1m; p.H. 7.4) con paraformaldehído (2%) y ácido pícrico (0.18%) por 12 horas y posteriormente transferidas a un buffer de sucrosa (30%) por 24 horas. Las rebanadas se congelaron y se cortaron con el procedimiento anteriormente descrito. Las secciones se preincubaron con BSA (5%) por dos horas y se incubaron con los anticuerpos primarios cabra anti-ChAT (1:200; Chemicon) en PBS, Tritón X-100 (0.3% y BSA (5%) por toda una noche en un ambiente húmedo a temperatura ambiente. Como controles, algunos cortes fueron procesados simultáneamente sin el anticuerpo primario. Después del lavado se incubaron en anticuerpos biotinilados IgG anti-cabra (1:100; Vector) por una hora seguido por Texas Red Avidina (1:200; Vector) por una hora. Finalmente los cortes se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector) y se examinaron con un microscopio de epifluorescencia. Se seleccionaron cortes para ser analizados posteriormente en un microscopio confocal (MRC 1024 Bio-Rad) equipado con un láser argón/kriptón. Las señales del marcaje de fluorescencia se obtuvieron con excitación de longitud de onda de 488nm y las señales de la IR a ChAT se obtuvieron con excitación de longitud de onda de 568nm. Las adquisiciones para cada longitud de onda se obtuvieron por separado en el mismo campo y la combinación de estas señales se procesó digitalmente con el programa Confocal Assistant (Todd Clark Brelje). La señal roja corresponde a la IR

a la ChAT y la señal en verde corresponde a la Dextran-amina fluorescencia. La co-localización de ambos anticuerpos se observa en color amarillo (fig.5.9).

El análisis estadístico se llevo a cabo mediante las pruebas ANOVA de una vía y post-hoc Scheffé y mediante la prueba t- student para muestras independientes y muestras pareadas.

RESULTADOS

Activity-Dependent Induction of Multitransmitter Signaling Onto Pyramidal Cells and Interneurons of Hippocampal Area CA3

Héctor Romo-Parra,^{1,*} Carmen Vivar,^{1,*} Jasmín Maqueda,¹ Miguel A. Morales,² and Rafael Gutiérrez^{1,*}

¹Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 07000;

and ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510

Submitted 30 October 2002; accepted in final form 6 February 2003

Romo-Parra, Héctor, Carmen Vivar, Jasmín Maqueda, Miguel A. Morales, and Rafael Gutiérrez. Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3. *J Neurophysiol* 89: 3155–3167, 2003. First published February 12, 2003; 10.1152/jn.00985.2002. The granule cells of the dentate gyrus (DG) are considered to be glutamatergic, but they contain glutamic acid decarboxylase, γ -amino butyric acid (GABA), and the vesicular GABA transporter mRNA. Their expression is regulated in an activity-dependent manner and coincides with the appearance of GABAergic transmission from the mossy fibers (MF) to pyramidal cells in area CA3. These data support the hypothesis that MF are able to release glutamate and GABA. Following the principle that a given neuron releases the same neurotransmitter(s) onto all its targets, we here demonstrate the emergence, after a generalized convulsive seizure, of MF GABAergic signaling sensitive to activation mGluR-III onto pyramidal cells and interneurons of CA3. Despite this, excitation overrides inhibition in interneurons, preventing disinhibition. Furthermore, on blockade of GABA and glutamate ionotropic receptors, an M1-cholinergic depolarizing signal is also revealed in both targets, which postsynaptically modulates the glutamatergic and GABAergic fast neurotransmission. The emergence of these nonglutamatergic signals depends on protein synthesis. In contrast to cholinergic responses evoked by associational/commissural fibers activation, cholinergic transmission evoked by DG stimulation is only observed after seizures and is strongly depressed by the activation of mGluR-II, whereas both are depressed by M2-AChR activation. With immunohistological experiments, we show that this cholinergic pathway runs parallel to the MF. Thus seizures compromise a delicate balance of excitation and inhibition, on which a complex interaction of different neurotransmitters emerges to counteract excitation at pre- and postsynaptic sites. Particularly, MF GABAergic inhibition emerges to exert an overall inhibitory action on CA3.

INTRODUCTION

The normally glutamatergic granule cells of the dentate gyrus (DG) monosynaptically excite pyramidal cells and interneurons in hippocampal area CA3 through their mossy fibers (MF). The interneurons are the main targets of the MF (Acsády et al. 1998); therefore after being excited, they inhibit pyramidal cells and other interneurons (Miles et al. 1996; Urban and Barrionuevo 1998). Thus excitatory and inhibitory synaptic

responses in CA3 to MF stimulation disappear when glutamatergic transmission is blocked, indicating that GABAergic responses are disynaptically mediated (Buzsáki 1984; Crawford and Connor 1973; Dichter and Spencer 1969; Yamamoto 1972).

However, we recently demonstrated that after seizures (Gutiérrez 2000; Gutiérrez and Heinemann 2001) or after synaptic or direct kindling-like stimulation of the DG in vitro without inducing epileptiform activity (Gutiérrez 2002), MF activation evokes monosynaptic GABAergic potentials in pyramidal cells. This and immunohistochemical (Ramírez and Gutiérrez 2001; Schwarzer and Sperk 1995; Sloviter et al. 1996) and neurochemical evidence (Gómez-Lira et al. 2002; Taupin et al. 1994a,b) suggest that granule cells can synthesize and release GABA in an activity-dependent manner. Furthermore, we also demonstrated that the granule cells and their MF contain and express the vesicular GABA transporter (VGA⁺) mRNA in an activity-dependent manner (Lamas et al. 2001).

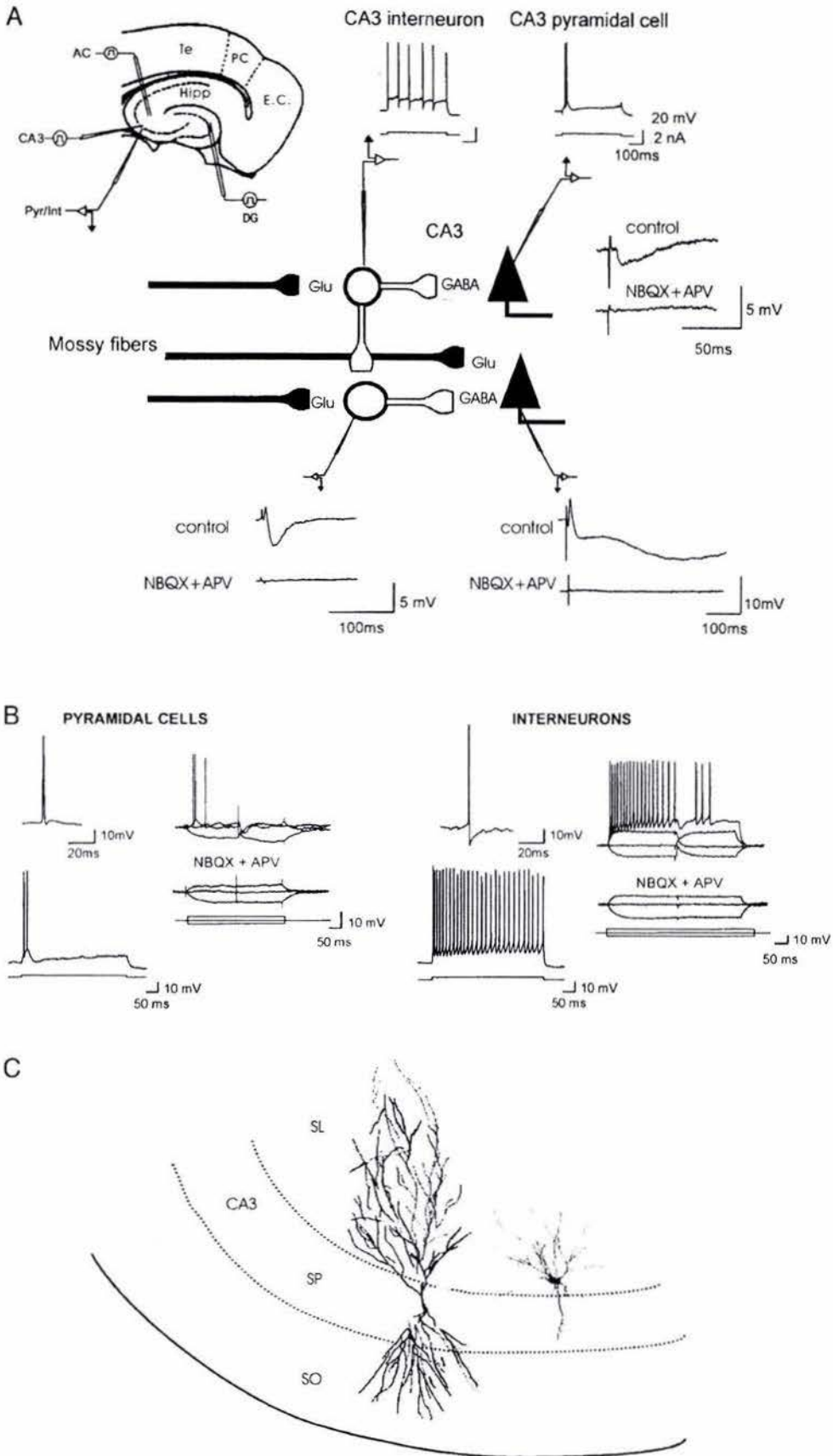
It is a general principle that all the terminals of a given neuron release the same neurotransmitter(s). However, because the MF are functionally compartmentalized (Maccaferri et al. 1998; Tóth et al. 2000), it is reasonable to consider the possibility that release of glutamate and GABA from MF could also be segregated according to the type of target onto which they impinge. Therefore to support the hypothesis that MF release glutamate and GABA, it was important to test whether the simultaneous glutamatergic and GABAergic transmission is expressed onto both MF targets in CA3: the pyramidal cells and the interneurons.

Interestingly, in a previous study (Gutiérrez and Heinemann 2001), we described that after the blockade of the aforementioned MF-evoked GABAergic response a putative cholinergic response could be uncovered. However, cholinergic transmission to area CA3 has been shown to come exclusively from the associational/commissural fibers (A/C), and its modulation in the MF projection is exerted through indirect synaptic interactions, whereby inhibitory interneurons are excited and presynaptically modulate MF glutamate release (Vogt and Regehr 2001). In view of this, we decided to characterize the seizure-induced DG-evoked cholinergic transmission onto CA3 and compare it to that evoked by the stimulation of the stratum radiatum, where the A/C pathway is known to pass (Vogt and

*H. Romo-Parra and C. Vivar contributed equally to this work.

Address for reprint requests: R. Gutiérrez, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 14-740, México D.F. 07000 (E-mail: rafa@fisio.cinvestav.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.



Regehr 2001). This would also clarify how these responses interact in CA3 neurons.

Here we demonstrate that after a generalized convulsive seizure, DG activation evokes monosynaptic GABAergic and M1-cholinergic responses both in pyramidal cells and interneurons of CA3, through the activation of different pathways, each with a distinctive pharmacological profile that permits their selective presynaptic modulation. Their emergence depends on protein synthesis.

METHODS

Electrophysiological recordings and analysis

For our electrophysiological experiments, we used control and pentylenetetrazol (PTZ)-injected Wistar rats (230–250 g). The intraperitoneal injection of PTZ (Sigma; 70 mg/kg) invariably induced a generalized convulsive clonic-tonic seizure that lasted 80–120 s, after which myoclonias and wet-dog shakes were apparent. The rats were decapitated under deep ether anesthesia. All experimental procedures were approved by the Committee on Ethical Animal Research of our Institution and of the Ministry of Health. Brains were rapidly dissected and combined entorhinal cortex-hippocampus slices (400 μ m) were cut with a vibro slicer (Campden Instruments, England) submerged in oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at 4°C. The PTZ-treated group was decapitated 1 h after the injection. For some experiments, slices from control and PTZ-treated rats were incubated in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) in the presence of cycloheximide (60 μ M) or anisomycin (100 μ M) (Jones et al. 1992; Otani et al. 1992) for \geq 2 h before they were transferred to the recording chamber. All slices, including those preincubated with the protein synthesis blockers, were transferred to a moisturized air-liquid interface recording chamber where they were constantly perfused with oxygenated normal ACSF at 35°C for 1 h before the recordings started. The ACSF contained (in mM) 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 MgSO_4 , 2 CaCl₂, 26 NaHCO_3 , and 10 glucose; pH 7.35. The drugs used were diluted at the desired concentration in the ACSF, namely: the NMDA type glutamate receptor antagonist, (DL)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV; 30 μ M; Tocris), and the non-NMDA type glutamate receptor antagonist 6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinolaxine-2,3-dione (NBQX; 10 μ M; Tocris); the GABA_A receptor antagonist bicuculline methiodide (20 μ M; Sigma); the GABA_B receptor antagonist CGP55845A (1 μ M; a gift from Novartis); the M1-cholinergic antagonists: pirenzepine (10 μ M; RBI), atropine (10 μ M; Sigma), and muscarinic toxin (MT7; 100 nM; Peptide Institute); the M2-cholinergic agonist oxotremorine (1 μ M; Sigma); the group II mGluR agonist (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV; 1 μ M; Tocris); the group III mGluR agonist L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4; 10 μ M; Tocris); and the protein synthesis inhibitors, cycloheximide (60 μ M; Sigma) and anisomycin (100 μ M; Sigma).

An hour after incubation in normal ACSF, intracellular recordings were done with an AxoClamp 2B amplifier (Axon Instruments) and borosilicate microelectrodes (70–90 M Ω ; Brown-Flaming Puller) filled with 2M potassium acetate and 2% biocytin (Sigma). Electrophysiologically identified pyramidal cells were recorded from regions

CA3a and -b, and interneurons were all recorded from the marginal zone between the stratum lucidum and s. pyramidale of region CA3b (Fig. 1). Anatomical identification of the recorded cells was later carried out by the intracellular injection of biocytin. The signals were acquired and analyzed off-line with the program pClamp8 (Axon Instruments). The duration of the action potential, and the duration and amplitude of the afterhyperpolarization were measured as previously described (Scharfman 1995). The onset latency of the synaptic responses was measured from the beginning of the stimulation artifact to the first inflection point of the first derivative of the synaptic potential with the cursor measure function of Clampfit. Membrane input resistance, rise time, and time to peak of the synaptic responses were measured with the built-in functions of Clampfit. The results are expressed as means \pm SE.

Electrical stimulation was provided with bipolar glass-insulated platinum wire (50 μ m) electrodes over the molecular layer of the DG and over the s. radiatum of the CA3 region (Vogt and Regehr 2001) (Fig. 1A). Pulses of 0.1 ms were delivered at a current intensity that evoked 75% of the excitatory postsynaptic potential (EPSP) amplitude needed to reach threshold for evoking action potentials. In the CA3 region, a glass pipette (1–2 M Ω) filled with ACSF was positioned 200–300 μ m apart from the recorded cell to stimulate local interneurons with monopolar pulses of 0.1 ms.

Immunohistological experiments

MF INTRACELLULAR LABELING. Slices to which a crystal of dextran, fluorescein (MW 3000; Molecular Probes) was inserted in the granular cell layer of the DG with a patch pipette were perfused with ACSF for 5 h and immersed in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) with paraformaldehyde (4%) for 12 h and then transferred to a buffer with sucrose (30%) for 24 h. They were frozen and cut at 14 μ m in a cryostat (Leica, CM 1850) and recovered in gelatin-coated slices. Some slices were counterstained with Evans blue (Sigma). These were covered with Vectashield (Vector) and observed and photographed under an epifluorescence microscope with appropriate filters for FITC and Texas Red (Nikon Optiphot-2).

For detection of cholin-acetyl-transferase (ChAT) immunoreactivity, four slices from 2 PTZ-treated rats and from two control rats were processed after MF dextran, fluorescein staining. The slices were fixed in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4) with paraformaldehyde (2%) and picric acid (0.18%) for 12 h and transferred to a buffer with sucrose (30%) for 24 h. The slices were frozen, cut, and mounted as described in the preceding text. Sections were preincubated with BSA (5%) for 2 h and incubated with goat polyclonal anti-ChAT (human) antibody (1:200; Chemicon) in PBS, Triton X-100 (0.3%) and BSA (5%) overnight in a humid atmosphere at room temperature. For control purposes, some sections were simultaneously processed in the absence of the primary antibody. After rinsing, they were incubated with biotinylated anti-goat IgG (1:100; Vector) 1 h, followed of avidine-Texas Red (1:200, Vector) 1 h. Finally sections were coverslipped with Vectashield fluorescent mounting medium (Vector) and examined with an epifluorescent microscope. Selected sections were analyzed with a scanning confocal microscope (MRC 1024 Bio-Rad) equipped with an argon/krypton laser. Images of the preparations stained with dextran, fluorescein were acquired with an excitation wavelength of 488 nm and ChAT Texas-red fluorescence with 568

FIG. 1. Mossy fibers (MFs) make monosynaptic contact with pyramidal cells and interneurons in CA3, which, in turn, inhibit pyramidal cells. *A:* schematic representation of the experimental arrangement showing the sites of recording and stimulation and the schematic synaptic arrangement of the MF synapse. Stimulation over the dentate gyrus (DG) excites granule cells and their MF, which produce a monosynaptic excitatory postsynaptic potential (EPSP) followed by polysynaptic inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) in pyramidal cells and interneurons. Therefore glutamate receptors' antagonists block all synaptic responses in control preparations. *B:* the characteristics of the action potential and responses to depolarizing pulses make both types of neurons clearly distinguishable. During the DC pulses, stimulation was delivered to the DG to evoke synaptic responses, which are blocked by perfusion of glutamate receptors' antagonists. Pyramidal cells rmp, -65 mV; interneuron rmp, -67 mV. Traces in *A* are an average of 6–10 synaptic responses. *C:* digital reconstruction of a biocytin labeled interneuron and of a pyramidal cell from a series of 5 superimposed 50- μ m slices.

nm. Acquisitions for each wavelength were done separately over the same fields and the combined renditions were digitally processed with the computer program Confocal Assistant (Tood Clark Brelje). The red signal corresponds to ChAT Texas red fluorescence and the green signal to dextran, fluorescein fluorescence. Colocalization of both signals would render a yellow labeling.

RESULTS

Typical responses of pyramidal cells to depolarizing pulses showed a burst of two or three action potentials followed by a hyperpolarization. On the other hand, interneurons recorded in the marginal zone between the stratum lucidum and stratum pyramidale of region CA3b were characterized by a sustained firing of action potentials during the depolarizing pulse, with little or no accommodation (Fig. 1, *A* and *B*). Cells that did not meet these criteria were not included in our study. The duration and shape of the action potential were distinctive for each cell type. The characteristics of the action potential, the resting membrane potential (rmp) and input resistance of both types of cells in control and PTZ-treated preparations are summarized in Table 1.

Synaptic responses of pyramidal cells and interneurons to MF activation in control preparations

DG stimulation evoked in pyramidal cells and interneurons EPSP/inhibitory postsynaptic potential (IPSP) sequences, which were completely blocked by the perfusion of non-*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and NMDA receptors' antagonists (NBQX and APV; Fig. 1, *A* and *B*). The values of the amplitude, onset latency, time to peak and rise time of the

monosynaptic control EPSP in pyramidal cells and interneurons are summarized in Table 1.

MF activation provokes GABAergic synaptic responses in pyramidal cells and interneurons after seizures

On DG stimulation, the pyramidal cells of the PTZ group responded with EPSP/IPSP sequences (Figs. 2, *A1*, and *C1*, and *3A1*). In interneurons, however, only an EPSP was evident (Figs. 2, *A2* and *C2*, *3A2*). The values of the amplitude, onset latency, time to peak, and rise time of the monosynaptic EPSP in pyramidal cells and interneurons are summarized in Table 1. As compared with the control preparations, the amplitude, rise time, and time to peak of the EPSP evoked in both types of cells were statistically different in the PTZ group (Student's *t*-test; $P < 0.01$; the stimulation intensity was normalized as described in METHODS).

During the blockade of glutamatergic transmission, MF activation evoked fast IPSPs in pyramidal cells (Figs. 2, *B1* and *C1*, and *3A1*) and in interneurons (Figs. 2, *B2* and *C2*, and *3A2*), whose onset latencies were, for pyramidal cells: 4.3 ± 0.3 ms ($n = 25$) and for interneurons, 4.8 ± 0.06 ms ($n = 10$). The latency of the isolated IPSP for each cell type is not different to that of the corresponding control EPSP as determined by a one-way ANOVA test and Scheffé post-ANOVA contrast ($P < 0.01$ (pyramidal cells, $F = 0.07$; interneurons, $F = 6.46$) and the variability of the latency of the IPSP (and that of the EPSP) for each neuron type is consistent with a monosynaptic contact (pyramidal cells, $F = 2.5$; interneurons, $F = 1.4$; Fig. 3*A*, 1 and 2, bar graphs).

The values of the amplitude, onset latency, time to peak, and

TABLE 1. Statistical comparison PTZ vs. control

	Pyramidal Cells		Interneurons	
	Control	Postseizure	Control	Postseizure
Input resistance, M Ω	37 \pm 2 (25)	38 \pm 1 (93)	57 \pm 16 (6)	46.6 \pm 5 (23)
Resting membrane potential, mV	-63 \pm 2 (25)	-64 \pm 1 (93)	-63 \pm 4 (6)	-68 \pm 2 (23)*
Action potential duration, ms	1.3 \pm 0.02 (20)	1.4 \pm 0.02 (20)	1.05 \pm 0.2 (6)	1.3 \pm 0.1 (23)
AHP amplitude, mV	5.4 \pm 1 (25)	4.8 \pm 1.5 (20)	10 \pm 2 (6)	14.1 \pm 1 (23)**
AHP duration, ms	6.2 \pm 0.2 (25)	6.4 \pm 0.3 (20)	33 \pm 14 (6)	35 \pm 7 (23)
DG-EPSP amplitude, mV	4.6 \pm 0.4 (30)	6.3 \pm 0.2 (93)**	4.2 \pm 0.3 (6)	5.4 \pm 0.5 (16)**
DG-EPSP onset latency, ms	4.5 \pm 0.2 (30)	4.4 \pm 0.8 (93)	4.3 \pm 0.2 (6)	4.6 \pm 0.1 (16)
DG-EPSP time to peak, ms	14 \pm 0.2 (30)	12 \pm 0.4 (93)**	7.1 \pm 0.2 (6)	11 \pm 0.9 (16)**
DG-EPSP rise time, 10–90%; ms	2.5 \pm 0.2 (30)	3.9 \pm 0.3 (93)**	1.8 \pm 0.3 (6)	3.2 \pm 0.3 (16)**
DG-IPSP amplitude, mV	—	3.4 \pm 0.4 (25)	—	1.7 \pm 0.4 (10)
DG-IPSP onset latency, ms	—	4.3 \pm 0.3 (25)	—	4.8 \pm 0.06 (10)
DG-IPSP time to peak, ms	—	19 \pm 0.1 (25)	—	13.5 \pm 0.6 (10)
DG-IPSP rise time, 10–90%; ms	—	14 \pm 1.2 (25)	—	7.5 \pm 0.8 (10)
DG-IPSP reversal potential	—	-67 \pm 0.7 (25)	—	-69.4 \pm 0.6 (10)
DG-EPSPm onset latency, ms	—	6.1 \pm 0.2 (93)	—	6.8 \pm 0.4 (5)
DG-EPSPm amplitude, mV	—	1.8 \pm 0.1 (93)	—	0.8 \pm 0.1 (5)
DG-EPSPm duration, ms	—	137 \pm 5 (93)	—	201 \pm 7 (5)
DG-EPSPm rise time, 10–90%; ms	—	20.5 \pm 0.1 (93)	—	38.6 \pm 5 (5)
DG-IPSP amplitude, mV; with ACh-antag.	—	6.8 \pm 0.8 (9)	—	1.8 \pm 0.1 (3)
DG-IPSP time to peak, ms; with ACh-antag.	—	11.2 \pm 0.2 (9)	—	13 \pm 0.5 (3)
DG-IPSP rise time, 10–90%; ms; with ACh-antag.	—	7 \pm 0.1 (9)	—	6.4 \pm 0.6 (3)
DG-IPSP reversal potential, with ACh-antag.	—	-72.4 \pm 0.6 (9)	—	-71.2 \pm 0.8 (3)
A/C-EPSPm onset latency, ms	7.3 \pm 0.1 (3)	4.6 \pm 0.1 (15)	—	—
A/C-EPSPm amplitude, mV	1.6 \pm 0.5 (3)	1.9 \pm 0.1 (15)	—	—
A/C-EPSPm duration, ms	98.3 \pm 2.8 (3)	113.9 \pm 2.4 (15)	—	—
A/C-EPSPm rise time, 10–90%; ms	17.9 \pm 2.4 (3)	18.4 \pm 0.1 (15)	—	—

Student's *t*-test; values are means \pm SE; *n* values are in parentheses. AHP, afterhyperpolarization; DG, dentate gyrus; EPSP and IPSP, excitatory and inhibitory postsynaptic potential; A/C, associational/commissural. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

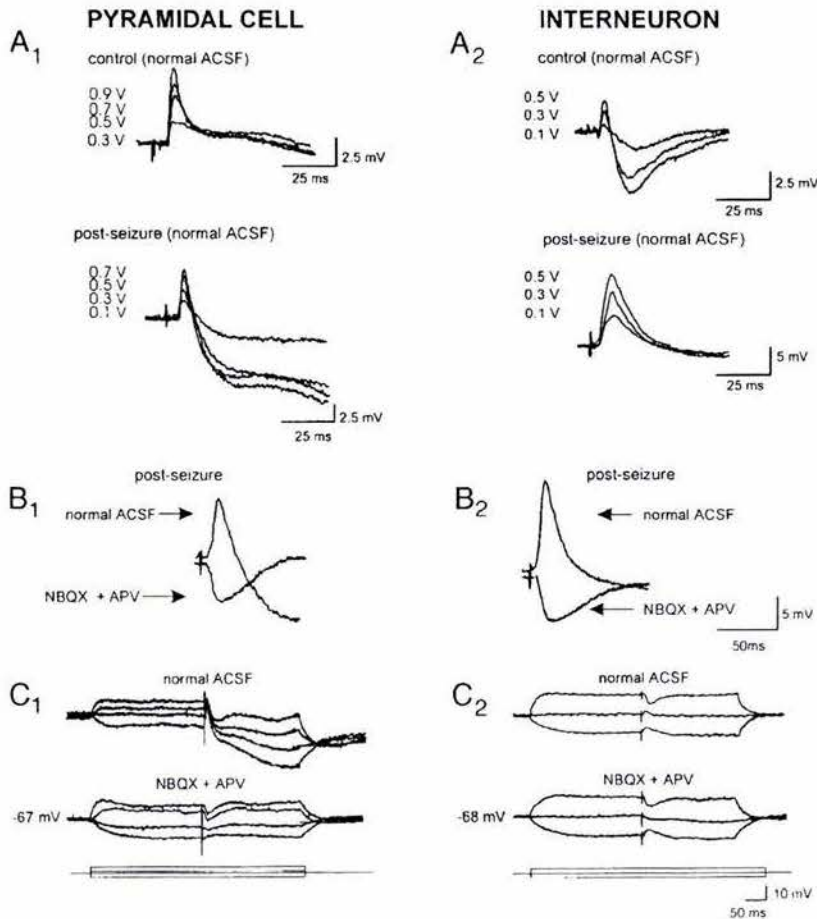


FIG. 2. Seizures induce the appearance of simultaneous glutamatergic and GABAergic synaptic potentials in pyramidal cells and interneurons in response to DG stimulation. Superimposed synaptic responses of pyramidal cells (A_1) and interneurons (A_2) evoked in normal artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at different stimulus intensities in control and pentylenetetrazol (PTZ)-treated preparations (postseizure). On stimulation intensity increments, the EPSP of the pyramidal cells (A_1) of the control group increased, whereas the IPSP barely changed. On the contrary, in the PTZ-treated group the IPSP presented a more pronounced increment as compared with the EPSP. A_2 : the interneurons showed the opposite behavior, whereby in the control group, the IPSP augmented as the stimulus intensity was increased (rmp: -65 mV) and in the PTZ-treated group, stimulus intensity increments evoked a more pronounced EPSP and no IPSP could be detected (rmp: -65 mV). B : superimposed fast synaptic responses in normal ACSF and during perfusion of glutamate receptors' antagonists of a pyramidal cell (B_1 : rmp: -66 mV) and of an interneuron (B_2 : rmp: -67 mV) in a PTZ-treated preparation. C : the synaptic responses evoked during the DC current pulses in normal ACSF behaved as expected for glutamatergic and GABAergic signals, however, during the perfusion of glutamate receptors' antagonists, an IPSP with characteristics of a GABAergic signal could be isolated, and reversed at a potential consistent with GABA transmission in both MF targets. No difference in input membrane resistance was observed in PTZ-treated preparations as compared with controls. Traces in A and B are averages of 6–10 synaptic responses.

rise time of the MF IPSP in pyramidal cells and interneurons are summarized in Table 1. The reversal potential of the IPSP obtained in pyramidal cells (-67 ± 0.7 mV; $n = 25$) and in interneurons (-69.4 ± 0.6 mV; $n = 10$; Fig. 2C, 1 and 2) was consistent with GABAergic responses, as also evidenced by its blockade with bicuculline (Fig. 3A, 1 and 2).

DG stimulation evokes cholinergic responses in CA3 after seizures

In contrast to control slices, in PTZ-treated preparations the stimulation of the DG in the presence of glutamate receptors' antagonists and bicuculline provoked a slow depolarizing potential (EPSPm), both in pyramidal cells (Fig. 3A1) and interneurons (Fig. 3A2). The mean amplitude, rise time, duration, and onset latency for this EPSPm both in pyramidal cells and interneurons are summarized in Table 1. On higher stimulation intensity, this EPSPm was enhanced but did not evoke action potentials in neither of the CA3 targets (not shown).

We then compared the EPSPm evoked by stimulation of the DG to that evoked by stimulation of the A/C fibers (Vogt and Regehr 2001). The characteristics of the A/C-evoked EPSPm are depicted in Table 1. Figure 3B shows the experimental arrangement and the responses to DG and A/C stimulation. Perfusion of glutamate receptors' antagonists block all synaptic responses to DG stimulation in control animals, but A/C stimulation evoked an EPSPm that could be pharmacologically

isolated by perfusion of glutamatergic and GABA_{A,B} antagonists (Fig. 3B2). On the contrary, in the PTZ-group, DG stimulation evoked an EPSPm in the presence of glutamatergic and GABAergic antagonists. The selective M1 cholinergic blockers: atropine ($10 \mu\text{M}$; $n = 40$), pirenzepine ($10 \mu\text{M}$; $n = 50$), and MT7 (100 nM; $n = 6$), completely blocked the EPSPm evoked by both sites of stimulation, confirming unequivocally that they were mediated by M1 cholinergic receptors (Fig. 3C). Current pulses applied during the EPSPm revealed an increment of the input resistance of the pyramidal cells by $39 \pm 7\%$ ($n = 5$; Fig. 3D).

Alternatively, to determine if the blockade of cholinergic receptors prior to the perfusion of the GABA_A antagonist could alter the MF-evoked IPSP, we perfused cholinergic antagonists in the presence of glutamate receptors' antagonists. In these conditions, the MF IPSP evoked in pyramidal cells and interneurons had the characteristics depicted in Table 1, which show that the amplitude of the MF IPSP increases due to the blockade of the antagonizing depolarizing action of the cholinergic signal (Fig. 4, A and B) and the reversal potential of the IPSP shifts to -72.4 ± 0.6 ($n = 9$), coinciding with the reversal potential of the IPSP evoked by direct stimulation of interneurons (-72 ± 0.8 mV; $n = 10$), which does not recruit cholinergic fibers.

DG-evoked synaptic signals have a distinctive presynaptic modulation

Because activation of mGluR reduces neurotransmitter release from MF, we tested the effect of the mGluR-II agonist,

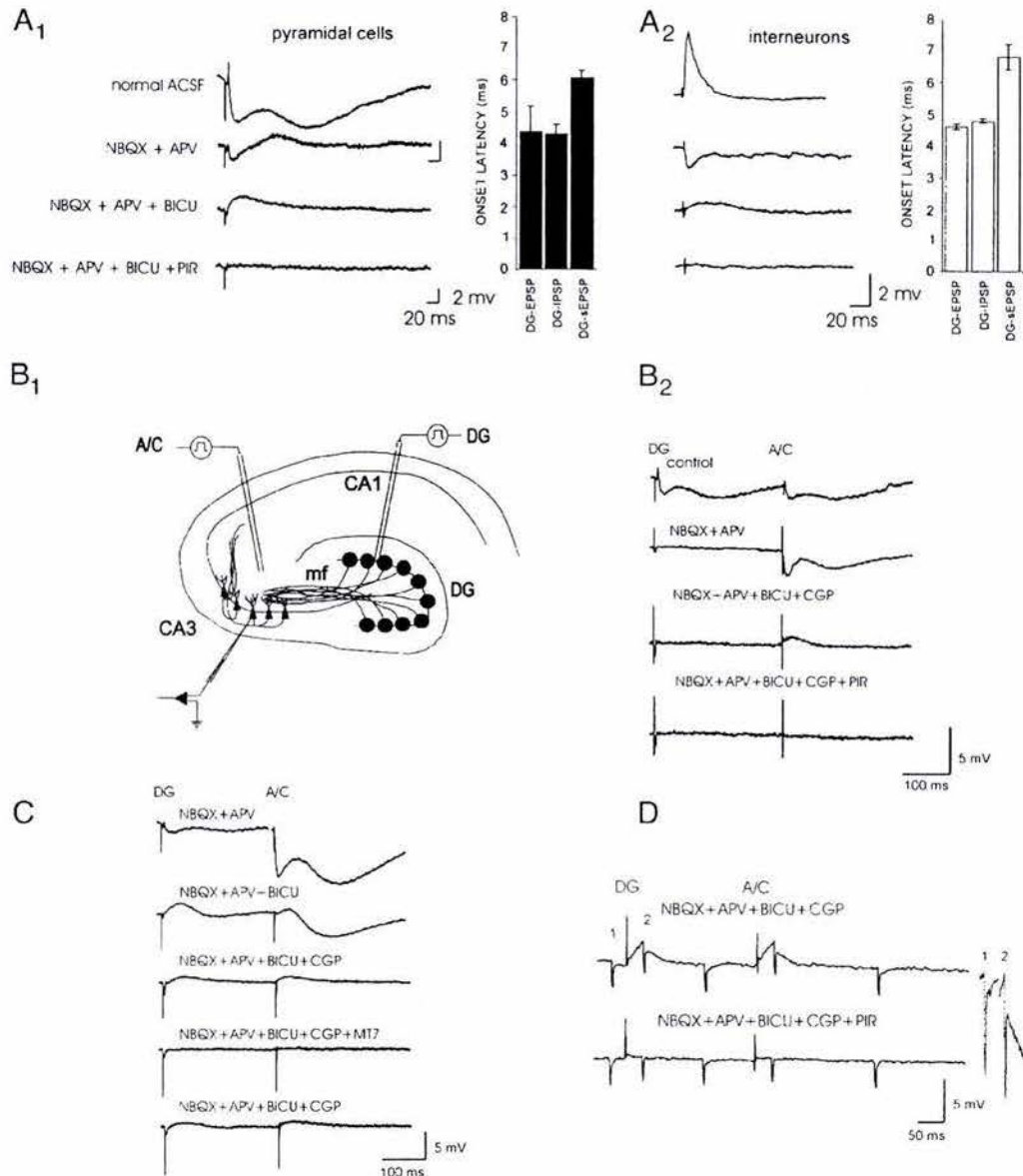


FIG. 3. DG stimulation simultaneously evokes a glutamatergic, a GABAergic, and a cholinergic potential both in pyramidal cells and interneurons of PTZ-treated rats. *A*: in normal ACSF, DG stimulation evokes EPSP/IPSP sequences in pyramidal cells (*A1*; rmp: -65 mV) and interneurons (*A2*; rmp: -67 mV). During perfusion with 6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinolaxine-2,3-dione (NBQX) + (DL)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV), a fast IPSP was isolated, which could be blocked by bicuculline. Its blockade revealed a slow EPSP that could be blocked with M1-cholinergic antagonists. The onset latencies of the EPSP, IPSP, and EPSPm evoked in each type of neuron are depicted in the corresponding bar graphs. *B1*: schematic representation of the hippocampus showing the sites of stimulation used to activate the associational/commissural (A/C) and the MF pathways. *B2*: synaptic responses of control CA3 pyramidal cells to DG and A/C stimulation (rmp: -66 mV). Perfusion of glutamate receptors' antagonists block all synaptic responses evoked by DG stimulation but isolate GABAergic potentials evoked by direct stimulation of interneurons within stratum radiatum. Perfusion of bicuculline and CGP55845A isolates an EPSPm, which was blocked by pirenzepine. *C*: in PTZ-treated preparations, both, DG and A/C stimulation evoke IPSPs during perfusion of glutamate receptors' antagonists. The perfusion of GABA_A and GABA_B antagonists isolates an EPSPm, which is completely and reversibly blocked by the highly selective M1-AChR toxin, MT7 (rmp: -65 mV). *D*: the input resistance of the cell augmented during the EPSPm, as revealed by passing hyperpolarizing current pulses (rmp: -66 mV). This effect was blocked by pirenzepine.

DCG-IV, and of the mGluR-III agonist, L-AP4 on the MF-evoked responses. We tested the effect of both agonists in a group of cells and found that the inhibitory effect of DCG-IV on the MF IPSP was milder (26%) than the effect of L-AP4 , which depressed the MF IPSP by 84% ($n = 11$; Fig. 4, *D* and *E*), coinciding with previously reported data (Gutiérrez 2000,

2002; Walker et al. 2001). This effect is selective for the MF-evoked IPSP because the inhibitory potentials evoked by direct stimulation of intrinsic interneurons of area CA3 were not affected ($n = 6$; Fig. 4*D*). Moreover, we found that L-AP4 perfused during the maximal effect of DCG-IV further inhibited the MF IPSP (Fig. 4*F*). Thereafter, the effect of L-AP4 was

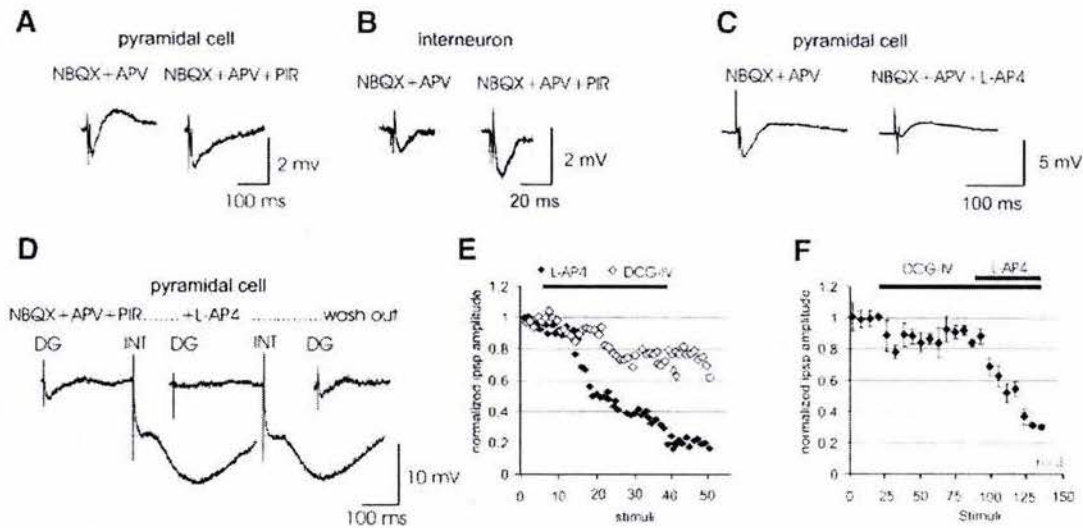


FIG. 4. The cholinergic component postsynaptically modulates the GABAergic response evoked by dentate stimulation. After the isolation of the fast IPSP with NBQX + APV, the perfusion of cholinergic antagonists resulted in an enhancement of the IPSP in pyramidal cells (*A*; rmp: -67 mV) and in interneurons (*B*; rmp: -68 mV) by the blockade of the underlying EPSPm. *C*: on the contrary, the perfusion of L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4) depressed the fast IPSP, leaving the EPSPm unaffected (rmp: -66 mV). *D*: the pharmacologically isolated IPSP evoked by DG activation is strongly inhibited by L-AP4, whereas neither the GABA_A- nor the GABA_B-dependent IPSPs evoked by direct interneuronal stimulation (INT) are modified (rmp: -64 mV). *E*: representative example of the effects of L-AP4 and (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV) on the IPSP evoked on a single cell. *F*: in a group of cells, L-AP4 inhibitory effect adds to that of DCG-IV. Stimuli were applied at 0.1 Hz. Traces in *A-C* are an average of 6–10 synaptic responses.

tested in the GABAergic synaptic responses in the first and last cells recorded from each slice (we usually recorded 3–4 cells per slice). L-AP4 inhibited the MF-IPSP to the same extent in 44 of 44 cells tested.

Because L-AP4 has the ability to depress the MF-evoked IPSP, therefore in the presence of glutamate receptors' antagonists, it should depress the IPSP and would uncover the underlying EPSPm, provided that the latter is not sensitive to L-AP4. As shown in Fig. 4*C*, L-AP4 strongly inhibits the IPSP without altering the EPSPm ($n = 4$). On the other hand, perfusion of L-AP4 had no effect on the isolated mEPSP (not shown).

To study the presynaptic modulation of the different cholinergic responses of pyramidal cells evoked by DG and A/C stimulation, EPSPm were evoked successively in the same pyramidal cells by alternating the site of stimulation (as depicted in Fig. 3*B*) in the presence of glutamatergic and GABAergic antagonists ($n = 93$). Also, the GABA_B-dependent IPSP was blocked with CGP55845A ($n = 12$). Under these conditions, we found that DCG-IV virtually blocked the DG- but not the A/C-evoked cholinergic responses, which remained unaltered ($n = 5$; Fig. 5, *A* and *B*). The responses to a paired pulse potentiation protocol showed that the effects are consistent with a presynaptic action of DCG-IV (Fig. 5*B*). Thus the activation of mGluR-II, but not of mGluR-III, inhibits the DG- but not the A/C-driven EPSPm. Due to this, one can think that MF could also be mediating the cholinergic potential. However, because, unlike extrinsic cholinergic fibers, MF do not express M2 receptors, we tested the effect of the M2 agonist, oxotremorine, on the EPSPm evoked by stimulation of both pathways. Oxotremorine completely and reversibly depressed both EPSPm ($n = 5$; Fig. 5, *C* and *D*), showing that the cholinergic transmission from the DG to CA3 is not of MF

origin and, contrary to the A/C cholinergic responses, is modulated by mGluR-II. For comparison purposes, we assessed the effect of oxotremorine on the fast glutamatergic DG-evoked EPSP of control preparations and confirmed its lack of effect ($n = 5$; Fig. 5*D*).

Emergence of nonglutamatergic signaling from the DG to CA3 after seizures depends on protein synthesis

Because the induction of the MF IPSP in vitro depends on protein synthesis (Gutiérrez 2002), we tested the effect of cycloheximide and anisomycin, protein synthesis blockers, on the seizure-induced nonglutamatergic signaling from the DG to CA3. After preincubation of the slices from seizing-rats in the protein synthesis blockers (see METHODS), synaptic potentials were evoked by DG and direct interneuron stimulation in pyramidal cells (9 for each inhibitor) and interneurons ($n = 3$; anisomycin). The perfusion of glutamate receptors' antagonists blocked all synaptic responses evoked by DG but not by direct stimulation of local interneurons in all the pyramidal cells and interneurons tested (Fig. 6). For comparison purposes, we carried out the same experiments in slices from control nontreated rats and from slices prepared from PTZ-treated rats 3 h after the onset of the seizure. In the former, EPSP/IPSP sequences could normally be evoked by DG stimulation. The perfusion of glutamate receptors' antagonists blocked all synaptic potentials evoked by DG stimulation, whereas an IPSP was evoked by direct interneuron stimulation, as previously shown in control nontreated slices ($n = 5$ for each inhibitor). On the other hand, in slices prepared 3 h after the seizure and then incubated in the blockers, nonglutamatergic transmission from DG to CA3 could still be evoked (not shown).

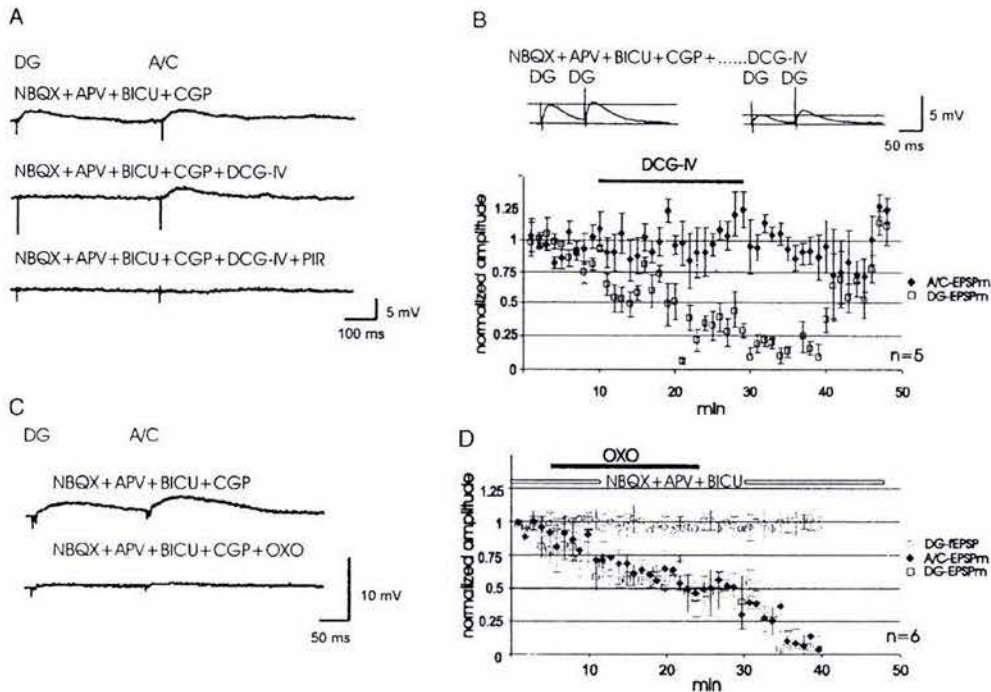


FIG. 5. DG- and A/C-evoked cholinergic potentials have different pharmacological profiles. *A*: the DG- but not the A/C-dependent pharmacologically isolated cholinergic response is strongly depressed by the perfusion of DCG-IV. The remaining A/C response can be blocked by pirenzepine (rmp: -67 mV). *B*: the inhibitory effect of DCG-IV on the first and potentiation of the 2nd response in the paired pulse paradigm is consistent with a presynaptic action (rmp -66 mV). The plot shows the differential effect of DCG-IV on the EPSPm evoked by each pathway in a group of 5 cells, where activation of mGluR-II strongly depresses DG- but not A/C-evoked EPSPm. Stimulation was provided at 0.1 Hz. *C*: the EPSPm's elicited by both inputs are sensitive to presynaptic activation of M2-cholinergic receptors (rmp: -67 mV). *D*: plot depicting the inhibitory effect of the putative M2 agonist, oxotremorine, on the DG- and A/C-evoked EPSPm in a group of 5 cells. Oxotremorine has no effect on the control DG-evoked glutamatergic fast EPSP (DG-fEPSP). Stimulation was provided at 0.1 Hz. Traces in *A*–*C* are an average of 6–10 synaptic responses.

ChAT-positive fibers pass through the DG and along MF in CA3

After anatomically identifying the MF with topical application of dextran, fluorescein into the DG (Fig. 7, *A* and *B*), we carried out immunofluorescence staining to ChAT (Fig. 7, *C*–*E*). Control experiments, in which slices were processed in the absence of primary antibody, did not present immunoreactivity (not shown). We were able to discard the colocalization

of ChAT and dextran, fluorescein in the granule cells or their MF both in control and PTZ-treated preparations. The perisomatic region of pyramidal cells and granule cells was densely immunoreactive to ChAT, where ChAT positive terminals were evident (Fig. 7*C*, 1 and 2). Also, fine fibers could be localized in stratum lucidum (Fig. 7*C*2). In addition, we found few cholinergic interneurons in the molecular layer of the DG (Fig. 7*D*1), whose orientation and terminals were restricted to the

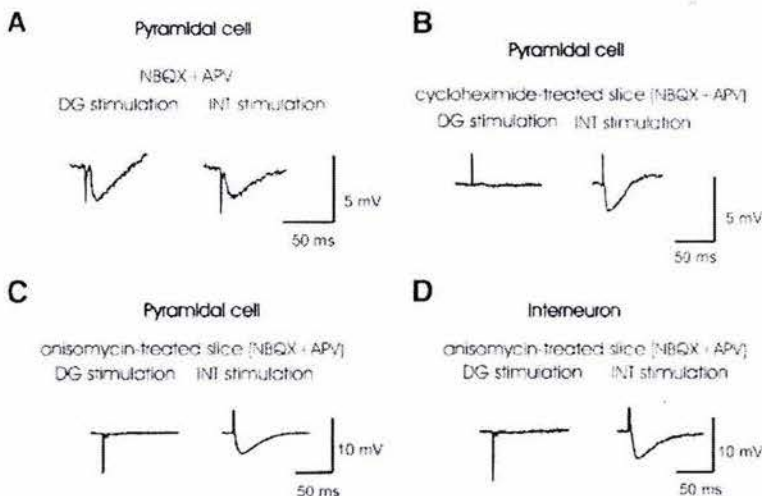


FIG. 6. The emergence of nonglutamatergic signaling evoked in pyramidal cells and interneurons by DG stimulation after seizures depends on protein synthesis. Contrary to PTZ-treated preparations incubated in normal ACSF (*A*), preincubation of the slices in cycloheximide prevents the appearance of nonglutamatergic DG-evoked potentials in the presence of glutamate receptors' antagonists (*B*). Anisomycin, another potent protein synthesis blocker, also prevents the appearance of nonglutamatergic DG-evoked potentials in the presence of glutamate receptors' antagonists both in pyramidal cells (*C*) and in interneurons (*D*) recorded from the same slice. By contrast, direct stimulation of interneurons within CA3 (INT) still elicited IPSPs in the same cells. Traces are an average of 6–10 synaptic responses.

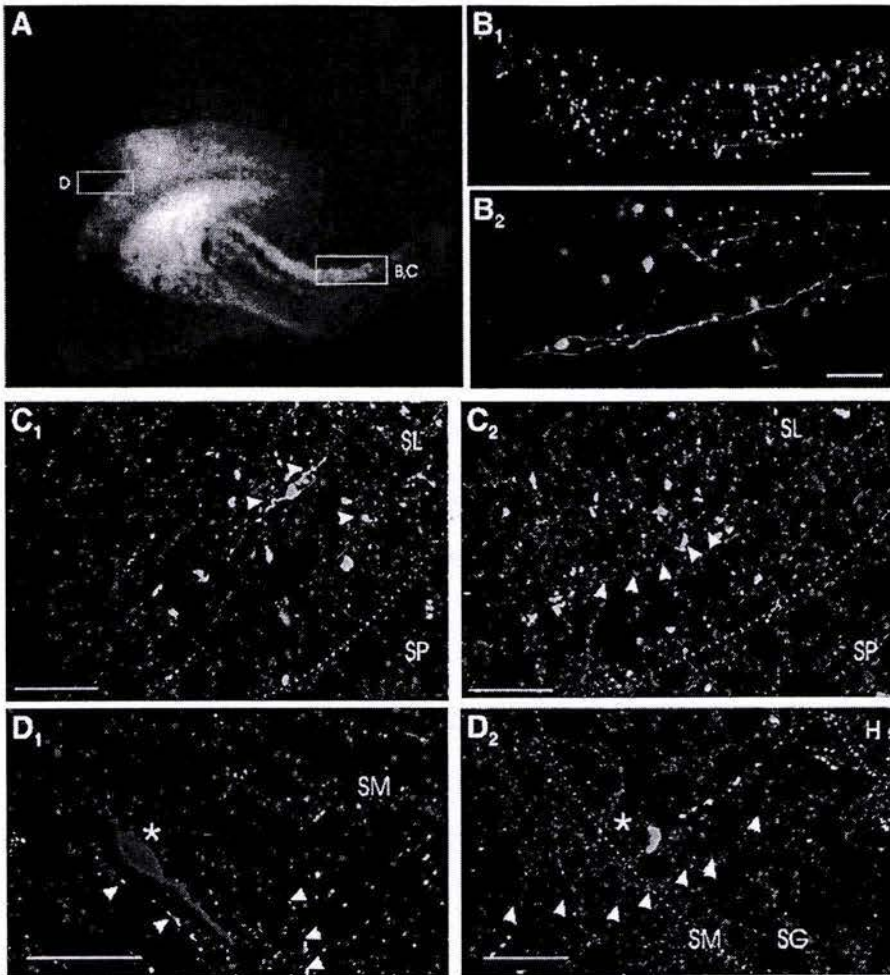


FIG. 7. ChAT immunofluorescence disclose a cholinergic plexus in the DG and CA3 but the MF are ChAT free. *A*: panoramic view of a hippocampal slice showing the MF stained with dextran, fluorescein. \square , the regions depicted in the next panels. *B*: MF in the stratum lucidum of CA3 stained with dextran, fluorescein at 2 magnifications. *C1*: in this preparation of a control rat, \blacktriangle show MF and their thorny spines (in green) surrounded by a plexus of ChAT-positive terminals and fibers (in red) in s. lucidum of CA3. No colocalization of the dextran, fluorescein and ChAT-positive signals was observed. *C2*: some (ChAT-positive) cholinergic fibers could be followed (\blacktriangle) and appeared to run parallel to the MF pathway. *D1*: scattered cholinergic (ChAT-positive) interneurons were consistently observed in the s. moleculare of the DG, whose processes remained within the limits of this region or reached the stratum granulosum. \blacktriangle , dendrites of granule cells of the DG, devoid of ChAT signal. *D2*: as in the hilus and s. lucidum of CA3, ChAT-positive fibers could be seen passing throughout the s. granulare. *C1* and *D1* correspond to control rats, whereas *C2* and *D2* to PTZ-treated rats. Calibration bars: *B1*, 100 μ m; *B2*, 20 μ m; *C* and *D*, 50 μ m. SL, s. lucidum; SM, s. moleculare; SG, s. granulare; SP, s. piramidale, H, hilus.

DG. Fibers positive to ChAT could be traced passing through the molecular (Fig. 7*D1*) and granular cell layers (Fig. 7*D2*). We found no apparent differences in ChAT staining between the control (Fig. 7, *C1* and *D1*) and PTZ (Fig. 7, *C2* and *D2*) groups.

DISCUSSION

Our results show that seizures induce simultaneous glutamatergic and GABAergic transmission from the MF to both their targets in CA3: the pyramidal cells and interneurons. Together with these signals, an M1-AchR-mediated cholinergic response develops that affects both targets, where the synaptic signals interact. The emergence of these DG-evoked GABAergic and cholinergic signals requires protein synthesis, and each is subjected to selective presynaptic modulation. This and our immunohistological and confocal microscopy experiments demonstrate that the cholinergic signal has an origin different from the mossy fibers. Figure 8 summarizes our conclusions.

Seizures induce simultaneous glutamatergic and GABAergic transmission from MF to its targets in area CA3

Supporting the hypothesis that MF are able to release GABA, we show that the different targets of MF in area CA3 respond with simultaneous glutamatergic and GABAergic po-

tentials. In control preparations, glutamate receptors' antagonists block all synaptic responses to DG stimulation both in pyramidal cells and interneurons, indicating that GABAergic potentials are disynaptically mediated. However, slices of the PTZ-treated group presented MF-evoked GABAergic responses in a condition in which all excitatory components are blocked, discarding polysynaptic contamination (Sik et al. 1994; Weisskopf and Nicoll 1995). However, there is evidence of the presence of GABAergic inputs to CA3, other than intrinsic interneurons, and of interneurons within area CA3c that can reach the hilar region (Sik et al. 1997). Although activation of these inputs cannot be entirely ruled out, the possibility that the GABAergic responses seen in our experiments are of interneuronal origin seems unlikely for three main reasons. 1) Stimulation of the hilus (Gutiérrez and Heinemann 2001) and of the granule and molecular layers of the DG (Gutiérrez 2000, 2002; Gutiérrez and Heinemann 2001) of slices of healthy nontreated animals does not produce GABAergic responses on pyramidal cells and interneurons of areas CA3a,b; however, after seizures or LTP-like stimulation, these responses appear. 2) The projections of the interneurons with CA3 targets are really CA3 interneurons, restricted to CA3c. This type of neuron, described by Sik et al. (1997) is in CA3 s. oriens and only few dendrites project to the hilus proper. 3) In slices from nontreated animals, after completely

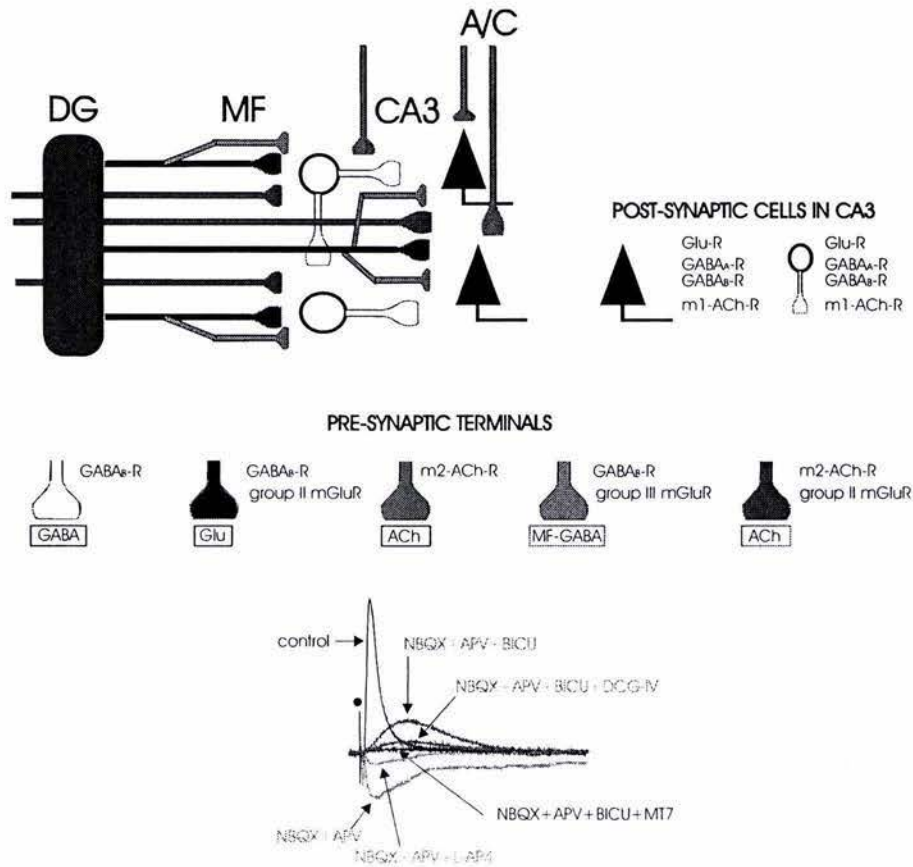


FIG. 8. Schematic diagram of the activity-dependent multitransmitter signaling onto CA3 targets. The scheme depicts the different fibers activated on DG stimulation, where each color represents the released neurotransmitter class, as indicated for each terminal below. Each of them possesses different presynaptic receptors, which permits their selective modulation. *Bottom*: an actual recording in CA3 showing the different synaptic components evoked by DG stimulation and their modulation explored in our study. The stimulation of the DG evokes a MF-driven glutamatergic EPSPs (black). The MF GABAergic IPSP (revealed after blocking glutamatergic transmission) can be originated from MF collaterals (blue) both onto pyramidal cells and interneurons of CA3. Together with this, cholinergic fibers are stimulated (red) evoking slow EPSPm, which modulates the postsynaptic integration of fast neurotransmission in both CA3 targets. GABA-releasing MF are mainly modulated by mGluR-III, whereas glutamate releasing MF are mediated by mGluR-II, suggesting that MF neurotransmission is compartmentalized. Also, the DG-evoked cholinergic transmission (red), but not the A/C-evoked cholinergic signaling (green), is presynaptically inhibited by activation of mGluR-II, but both cholinergic signals are modulated by presynaptic M2-cholinergic receptors. The DG-evoked cholinergic transmission is probably evoked by the activation of fibers that run along the MF pathway and that share similar presynaptic modulatory mechanisms. Therefore both pyramidal cells and interneurons in CA3 integrate a MF glutamatergic signal and simultaneous GABAergic and cholinergic signals, whose emergence depends on enhanced excitability and on protein synthesis.

blocking synaptic responses by the perfusion of glutamate receptors' antagonists, LTP-like stimulation of the DG induces the emergence of GABAergic responses. These are sensitive to mGluR activation and to protein synthesis blockade (Gutiérrez 2002), whereas GABAergic responses evoked by direct interneuron stimulation are not. This evidence strongly supports the notion of an activity-dependent mechanism and discards the possibility of stimulating interneurons projecting from the molecular layer of the DG to as far as CA3a,b.

Accordingly, the control EPSP and the pharmacologically isolated MF-evoked IPSP had the same latency, as previously reported (Gutiérrez 2000, 2002; Gutiérrez and Heinemann 2001; Walker et al. 2001). The activation of mGluR reduces neurotransmitter output from MF (Manzoni et al. 1995; Min et al. 1998; Salin et al. 1996) but has no effects on GABAergic transmission from interneurons in the DG (Tong et al. 1996) and in CA3 (this work; Walker et al. 2001). Thus that the latency of the IPSP isolated by the perfusion of glutamate receptors' antagonists is not affected in the presence of mGluR agonists, or of baclofen, a GABA_B agonist known to inhibit neurotransmitter release from MF and interneurons (Brown and Johnston 1983; Gutiérrez 2002), and even when perfusing them in a low-Ca²⁺ medium (Gutiérrez 2000) provide strong evidence that our recordings represent monosynaptic IPSPs of MF origin. Further support to the hypothesis that MF can release GABA is provided from works showing that GAD (Ramírez and Gutiérrez 2001; Schwarzer and Sperk 1995; Sloviter et al. 1996), GABA (Gómez-Lira et al. 2002), and VGAT mRNA (Lamas et al. 2001) are expressed in the granule

cells and their MF in an activity-dependent fashion. This is further confirmed by our experiments showing that protein synthesis is required to trigger the MF GABA-releasing process (see also Gutiérrez 2002). However, the cellular mechanisms by which the blockade of protein synthesis disrupts the expression of nonglutamatergic signaling cannot be inferred from our present results.

Walker et al. (2001) have found this MF inhibitory transmission to be normally present in young guinea pig slices. Although marked differences are known to exist in regard to MF physiology in the two species, we have recently determined (R. Gutiérrez, H. Romo-Parra, J. Maqueda, M. Ramírez, M. A. Morales and M. Lamas, unpublished results) that MF monosynaptic GABAergic signals can be normally detected in juvenile rats. Therefore the release of GABA from MF in the rat has possibly been previously observed (Ben-Ari et al. 1989) but not identified as such. In the light of our previous (Gutiérrez 2002) and present results, MF-GABAergic transmission can be recognized by its sensitivity to mGluR-III activation. It has been considered that MF glutamatergic neurotransmission in the rat is sensitive to the mGluR-II agonist, DCG-IV, but not to the mGluR-III agonist, L-AP4. The contrary is true for MF neurotransmission in the guinea pig (Bradley et al. 1996; Lanthorn et al. 1984; Shigemoto et al. 1997; but see Ohishi et al. 1993, 1995). That MF GABAergic signaling is strongly inhibited by the activation of the mGluR-III permits to suggest a link of mGluR-III to the GABA-releasing machinery and of mGluR-II to the glutamate releasing machinery, which has been shown to produce a downregulation of the exocytotic

machinery (Kamiya and Ozawa 1999). Therefore not only an inhibition of Ca^{2+} entrance explains inhibition of neurotransmitter release in MF as has been suggested (Vogt and Regehr 2001).

The granule cells and MF of the rat DG express groups II/III mGluR mRNA (Ohishi et al. 1993, 1995) and mGluR2,4,7 (Bradley et al. 1996; Lie et al. 2000; Shigemoto et al. 1997). Electron microscopy has revealed immunolabeling for the mGluR-III predominantly in presynaptic active zones of asymmetrical and symmetrical synapses, whereas mGluR-II immunolabeling was found in preterminal rather than terminal portions of axons (Shigemoto et al. 1996,1997). Our data suggest a presynaptic segregation of mGluR receptors according to the class of neurotransmitter to be released. Postsynaptically, GABA_A receptors cluster apposed to glutamatergic terminals in cultured pyramidal hippocampal cells suggesting that there is an element common to GABA and glutamate synapses (Rao et al. 2000).

Seizures induce mGluR-sensitive cholinergic transmission from the DG to pyramidal cells and interneurons in area CA3

Cholinergic responses of pyramidal cells and interneurons of the hippocampus usually appear on high-frequency or -intensity stimulation of their cholinergic afferents (Brunner and Misgeld 1994; Cole and Nicoll 1984; Morton and Davies 1997; Morton et al. 2001; Müller and Misgeld 1986), whereas single-pulse stimulation over the DG in the presence of glutamate receptors' antagonists does not elicit synaptic responses in control preparations. However, after seizures, single-pulse stimulation over DG evokes M1-AChR-dependent responses, suggesting that these fibers are probably silent in normal conditions, and they become transiently active after seizures (Gutiérrez and Heinemann 2001). We now establish that this is a process dependent on protein synthesis.

It has been described that the cholinergic input from the septum exerts its modulation in the MF pathway through the activation of interneurons, which in turn affect pyramidal cells (Martin and Alger 1999; Williams and Johnston 1990; Vogt and Regehr 2001). Our data show that M1-cholinergic signaling of DG origin directly activates both pyramidal cells and interneurons within CA3. This, contrary to the A/C evoked-cholinergic responses, is sensitive to activation of mGluR-II, whereas M2 -AChR activation depresses ACh release from both pathways. It has been described that activation of mGluR-II depresses MF but not A/C synapses (Manzoni et al. 1995) and muscarine directly inhibits the A/C synapse without directly affecting the MF synapse (Vogt and Regehr 2001), which does not have M2 receptors (Hájos et al. 1998), as we also confirm.

The cholinergic activation of different subsets of neurons and/or interneurons and, as we show, the activation of different cholinergic pathways with differential presynaptic modulation, regulate the overall synaptic integration in the hippocampus (Hasselmo and Fehlau 2001). Thus in PTZ-treated preparations, the DG-cholinergic signal postsynaptically modulates the convergent glutamatergic and GABAergic neurotransmission. In this way, this adds to other modulatory mechanisms in a pathway where spill over is a means by which collateral multi-target modulation is exerted together with pre- and

postsynaptic interactions in a parallel fashion (Hájos et al. 1998; Min et al. 1998; Rusakov et al. 1999; Semyanov and Kullmann 2000; Vogt and Regehr 2001).

Anatomical findings

Our immunohistological data discard the presence of ChAT in the MF and disclose a pathway that probably runs in parallel to this projection. As previously shown (Frotscher and Léránth 1985), we found ChAT-positive fibers to form a network around granule cells in the DG and pyramidal cells and interneurons in CA3. The terminals observed in the CA3 region are likely to be collaterals of those innervating the DG. In accordance with previous reports (Blaker et al. 1988; Frotscher et al. 2000), we observe the presence of few cholinergic interneurons, whose arborizations terminate locally within the s. moleculare of the DG. Additionally, Frotscher et al. (2000) showed that neither GAD₆₅ nor GAD₆₇ mRNA colocalizes with ChAT in cholinergic interneurons.

Functional implications

Our present data showing that MF glutamatergic and GABAergic neurotransmission can be observed both in pyramidal cells and interneurons and that MF GABAergic signaling has a distinctive presynaptic modulation suggest that distinct MF fiber collaterals are involved in MF GABAergic neurotransmission (Gutiérrez 2002). Its emergence has net inhibitory effects on pyramidal cells because the activation of MF at high frequencies provokes the more pronounced IPSPs in pyramidal cells of PTZ-treated rats to summate, hyperpolarizing the cells (Gutiérrez and Heinemann 2001). Although here we prove that MF GABAergic transmission is also expressed onto interneurons, which are the main targets of the MF (Acsády et al. 1998), we show that MF glutamatergic excitation surpasses the inhibitory transmission. Thus the interneurons are more readily excited than pyramidal cells, which continue to receive a strong inhibitory control from the interneurons within CA3, besides the MF GABAergic signal.

Beyond the attractive hypothesis of glutamate/GABA corelease from the MF, other important functional consequences arise. Our model (Fig. 8) proposes that selective activation of mGluR-II would inhibit excitatory transmission (glutamatergic from the MF, and cholinergic from the associated parallel fibers) but not MF inhibitory transmission, which in turn, can still exert presynaptic GABA_B-R activation and postsynaptically act on pyramidal cells and interneurons. Contrariwise, activation of mGluR-III would selectively inhibit inhibitory transmission without consequences in excitatory transmission, which could still further activate presynaptic mGluR. Finally, short- and long-term changes in the cholinergic system due to epileptic and stress-related phenomena are known to exist (Ferencz et al. 2001; Friedman et al. 1996; Kaufer et al. 1998; Lupica and Berman 1988; Mingo et al. 1997, 1998; Serra et al. 1997), whether these are related phenomena needs to be disclosed.

We thank J. Ayala for technical assistance and Dr. J. Bargas for helpful discussions throughout the project. We greatly appreciate the reviewers' comments, which have enriched our work.

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, Grants 29309-N and 36178-N to R. Gutiérrez.

REFERENCES

- Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, and Buzsáki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci* 18: 3386–3403, 1998.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, and Gaiarsa JL. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *J Physiol* 416: 303–325, 1989.
- Blaker SN, Armstrong DM, and Gage FH. Cholinergic neurons within the rat hippocampus: response to fimbria-fornix transection. *J Comp Neurol* 272: 127–138, 1988.
- Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, and Conn PJ. Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 16: 2044–2056, 1996.
- Brown TH and Johnston D. Voltage-clamp analysis of mossy fiber synaptic input to hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 50: 487–507, 1983.
- Brunner H and Misgeld U. Muscarinic amplification of fast excitation in hilar neurons and inhibition in granule cells in the guinea pig hippocampus. *J Physiol* 480: 513–526, 1994.
- Buzsáki G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol* 22: 131–153, 1984.
- Cole AE and Nicoll RA. Characterization of a slow cholinergic postsynaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 352: 173–188, 1984.
- Crawford IL and Connor JD. Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fiber pathway. *Nature* 244: 442–443, 1973.
- Dichter M and Spencer WA. Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. II. Mechanisms underlying origin and restriction. *J Neurophysiol* 32: 663–687, 1969.
- Ferenc I, Leanza G, Nanobashvili A, Kokaia Z, Kokaia M, and Lindvall O. Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience* 102: 819–832, 2001.
- Friedman A, Kaufer D, Shemer J, Hendler I, Soreq H, and Tur-Kaspa I. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nat Med* 2: 1382–1385, 1996.
- Frotscher M and Léránth C. Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 239: 237–246, 1985.
- Frotscher M, Vida I, and Bender R. Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* 96: 27–31, 2000.
- Gómez-Lira G, Trillo E, Ramírez M, Asai M, Sitges M, and Gutiérrez R. Expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse coincides with the seizure-induced expression of GABA in mossy fiber synaptosomes. *Exp Neurol* 177: 276–283, 2002.
- Gutiérrez R. Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84: 3088–3090, 2000.
- Gutiérrez R. Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87: 2562–2570, 2002.
- Gutiérrez R and Heinemann U. Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus-CA3 projection. *Eur J Neurosci* 13: 1371–1379, 2001.
- Hájos N, Papp ECS, Acsády L, Levey AI, and Freund TF. Distinct interneuron types express M2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* 82: 355–376, 1998.
- Hasselmo ME and Fehrlau BP. Differences in time course of ACh and GABA modulation of excitatory synaptic potentials in slices of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 86: 1792–1802, 2001.
- Jones LS, Grooms SY, Lapadula DM, and Lewis DV. Protein synthesis inhibition blocks maintenance but not induction of epileptogenesis in hippocampal slice. *Brain Res* 599: 338–344, 1992.
- Kamiya H and Ozawa S. Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fiber-CA3 synapse. *J Physiol* 518: 497–506, 1999.
- Kaufer D, Friedman A, Seidman S, and Soreq H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 28: 373–377, 1998.
- Lamas M, Gómez-Lira G, and Gutiérrez R. Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Mol Brain Res* 93: 209–214, 2001.
- Lanthorn TH, Ganong AH, and Cotman CW. 2-Amino-4-phosphonobutyrate selectively blocks mossy fiber-CA3 responses in guinea pig but not rat hippocampal neurons. *Neuron* 4: 741–749, 1984.
- Lie AA, Becker A, Behle K, Beck H, Malitschek B, Conn PJ, Kuhn R, Nitsch R, Plaschke M, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, and Blumcke I. Upregulation of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 in hippocampal neurons with reduced seizure vulnerability. *Ann Neurol* 47: 26–35, 2000.
- Lupica CR and Berman RF. Atropine slows olfactory bulb kindling while diminished cholinergic innervation does not. *Brain Res Bull* 20: 203–209, 1988.
- Maccaferri G, Tóth K, and McBain CJ. Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science* 279: 1368–1370, 1998.
- Manzoni O, Castillo PE, and Nicoll RA. Pharmacology of metabotropic glutamate receptors at the mossy fiber synapses of the guinea pig hippocampus. *Neuropharmacology* 34: 965–971, 1995.
- Martin LA and Alger BE. Muscarinic facilitation of the occurrence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* 92: 61–71, 1999.
- Miles R, Tóth K, Gulyás AI, Hájos N, and Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815–823, 1996.
- Min MY, Rusakov DA, and Kullmann DM. Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21: 561–570, 1998.
- Mingo NS, Cottrell GA, Mendonca A, Gombos Z, Eubanks JH, and Burnham WM. Amygdala-kindled and electroconvulsive seizures alter hippocampal expression of the m1 and m3 muscarinic cholinergic receptor genes. *Brain Res* 810: 9–15, 1998.
- Mingo NS, Cottrell GA, Zhang L, Wallace MC, Burnham WM, and Eubanks JH. Kainic acid-induced generalized seizures alter the regional hippocampal expression of the rat m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Epilepsy Res* 29: 71–79, 1997.
- Morton RA and Davies CH. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by adenosine receptors in the rat hippocampus. *J Physiol* 502: 75–90, 1997.
- Morton RA, Manuel NA, Bulters DO, Cobb SR, and Davies CH. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by GABA_B receptors in the rat hippocampus. *J Physiol* 535: 757–766, 2001.
- Müller W and Misgeld U. Slow cholinergic excitation of guinea pig hippocampal neurons is mediated by two muscarinic receptor subtypes. *Neurosci Lett* 18: 101–112, 1986.
- Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, and Mizuno N. Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* 360: 555–570, 1995.
- Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, and Mizuno N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 335: 252–266, 1993.
- Otani S, Roisin-Lallemant MP, and Ben-Ari Y. Enhancement of extracellular protein concentrations during long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* 47: 265–272, 1992.
- Rao A, Cha EM, and Craig AM. Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 8344–8353, 2000.
- Ramírez M and Gutiérrez R. Activity-dependent expression of GAD₆₇ in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 917: 139–146, 2001.
- Rusakov DA, Kullmann DM, and Stewart MG. Hippocampal synapses: do they talk to their neighbors? *Trends Neurosci* 22: 382–388, 1999.
- Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, and Nicoll RA. Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13304–13309, 1996.
- Scharfman H. Electrophysiological diversity of pyramidal-shaped neurons at the granule cell/hilus border of the rat dentate gyrus recorded in vitro. *Hippocampus* 5: 287–305, 1995.
- Schwarzer C and Sperk G. Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase 67 after limbic seizure in the rat. *Neuroscience* 69: 705–709, 1995.

- Semyanov A and Kullmann DM. Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 25: 663–672, 2000.
- Serra M, Dazzi L, Cagetti E, Chessa MF, Pisu MG, Sanna A, and Biggio G. Effect of pentylenetetrazole-induced kindling on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *J Neurochem* 68: 313–318, 1997.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, and Mizuno N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7503–7522, 1997.
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JD, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, and Somogyi P. Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381: 523–525, 1996.
- Sik A, Ylinen A, Penttonen M, and Buzsáki G. Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science* 265: 1722–1724, 1994.
- Sik A, Penttonen M, and Buzsáki G. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur J Neurosci* 9: 573–588, 1997.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, and Martin DL. Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373: 593–618, 1996.
- Taupin P, Ben-Ari Y, and Roisin MP. Subcellular fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: evoked release of glutamate, GABA, aspartate and glutamate decarboxylase activity in control and degranulated rat hippocampus. *Brain Res* 644: 313–321, 1994a.
- Taupin P, Zini S, Cesselin F, Ben-Ari Y, and Roisin MP. Subcellular fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: morphological and biochemical characterization in control and degranulated rat hippocampus. *J Neurochem* 62: 1586–1595, 1994b.
- Tong G, Malenka RC, and Nicoll RA. Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* 16: 1147–1157, 1996.
- Tóth K, Soares G, Lawrence JJ, Philips-Tansey E, and McBain CJ. Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *J Neurosci* 20: 8279–8289, 2000.
- Urban NN and Barrionuevo G. Active summation of excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11450–11455, 1998.
- Vogt KE and Regehr WG. Cholinergic modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 area of the hippocampus. *J Neurosci* 21: 75–83, 2001.
- Walker MC, Ruiz A, and Kullmann DM. Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29: 703–715, 2001.
- Weisskopf MG and Nicoll RA. Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature* 376: 256–259, 1995.
- Williams S and Johnston D. Muscarinic depression of synaptic transmission at the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurophysiol* 64: 1089–1097, 1990.
- Yamamoto C. Activation of hippocampal neurons by mossy fiber stimulation in thin brain sections in vitro. *Exp Brain Res* 14: 423–435, 1972.

Plasticity of the GABAergic Phenotype of the “Glutamatergic” Granule Cells of the Rat Dentate Gyrus

Rafael Gutiérrez,¹ Héctor Romo-Parra,¹ Jasmín Maqueda,¹ Carmen Vivar,¹ Mónica Ramírez,¹ Miguel A. Morales,² and Mónica Lamas¹

¹Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, México 07000, and ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, México 04510

The “glutamatergic” granule cells of the dentate gyrus transiently express a GABAergic phenotype when a state of hyperexcitability is induced in the adult rat. Consequently, granule cell (GC) activation provokes monosynaptic GABAergic responses in their targets of area CA3. Because GABA exerts a trophic action on neonatal CA3 and mossy fibers (MF) constitute its main input, we hypothesized that the GABAergic phenotype of the MF could also be transiently expressed early in life. We addressed this possibility with a multidisciplinary approach. Electrophysiological recordings in developing rats revealed that, until day 22–23 of age, glutamate receptor antagonists block the excitatory response evoked in pyramidal cells by GCs, isolating a fast metabotropic glutamate receptor-sensitive GABAergic response. In a clear-cut manner from day 23–24 of age, GC activation in the presence of glutamatergic antagonists was unable to evoke synaptic responses in CA3. Immunohistological experiments showed the presence of GABA and GAD₆₇ (glutamate decarboxylase 67 kDa isoform) in the developing GCs and their MF, and, using reverse transcription-PCR, we confirmed the expression of vesicular GABA transporter mRNA in the developing dentate gyrus and its downregulation in the adult. The GABAergic markers were upregulated and MF inhibitory transmission reappeared when hyperexcitability was induced in adult rats. Our data evidence for the first time a developmental and activity-dependent regulation of the complex phenotype of the GC. At early ages, the GABAergic input from the MF may add to the interneuronal input to CA3 to foster development, and, in the adult, it can possibly protect the system from enhanced excitability.

Key words: granule cells; mossy fibers; GABA; glutamate; development; plasticity; dentate gyrus; CA3

Introduction

During the first postnatal week, GABA exerts a depolarizing effect on CA3 hippocampal neurons, enabling NMDA receptors to activate (Leinekugel et al., 1997). From the second week, GABA exerts an inhibitory action (Gaiarsa et al., 1995; Ganguly et al., 2001), after which pyramidal cells reach adult features (Bayer, 1980). Thus, it has been proposed that the GABAergic input onto CA3 cells, thought to be originated in hilar and CA3 interneurons, exerts a trophic effect during development (Ben-Ari et al., 1994, 1997).

In the adult rat, the “normally glutamatergic” granule cells (GCs) of the dentate gyrus (DG) transiently express a GABAergic phenotype in an activity- and protein synthesis-dependent manner (Schwarzer and Sperk, 1995; Lehmann and Löscher, 1996; Sloviter et al., 1996; Lamas et al., 2001; Ramírez and Gutiérrez, 2001; Gómez-Lira et al., 2002; Gutiérrez, 2002), giving rise to GABAergic transmission from the mossy fibers (MFs) onto their

targets in CA3 (Gutiérrez, 2000, 2002; Gutiérrez and Heinemann, 2001; Romo-Parra et al., 2003).

If as suggested, MFs release GABA besides glutamate, pyramidal cells could be driven by the MF-GABAergic signaling as well during development and could constitute an effective means to support the glutamate–GABA synergism on developing postsynaptic cells (Leinekugel et al., 1997). Therefore, we hypothesized that GCs could normally express their GABAergic phenotype during development, when GABA is needed to exert a trophic input to pyramidal cells adding to the GABAergic input of the hilar and CA3 interneurons. After completion of development, the expression of the GABAergic phenotype could be downregulated to establish the adult interneuron-mediated disinhibitory inhibition onto CA3 targets. It is noteworthy that this possibility can also explain data showing that MF-GABAergic transmission is normally present in slices of young guinea pigs (Walker et al., 2001). We addressed this possibility and found that GABAergic markers are expressed in the GCs early in life, and MF-GABAergic transmission is normally observed in rats until day 22–23 of age. Strikingly, from this day on, activation of the GCs in the presence of glutamatergic antagonists no longer evokes synaptic responses in pyramidal cells while the GABAergic markers are downregulated. The induction of hyperexcitability reestablishes MF-GABAergic transmission and GABAergic markers expression.

Received Dec. 10, 2002; revised April 7, 2003; accepted May 7, 2003.

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 36178-N and by the Third World Academy of Sciences Grant 01-401 (R.G.). M.L. was supported by the G-Fund.

Correspondence should be addressed to Rafael Gutiérrez, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, México 07000. E-mail: grafael@fisio.cinvestav.mx.

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/235594-05\$15.00/0

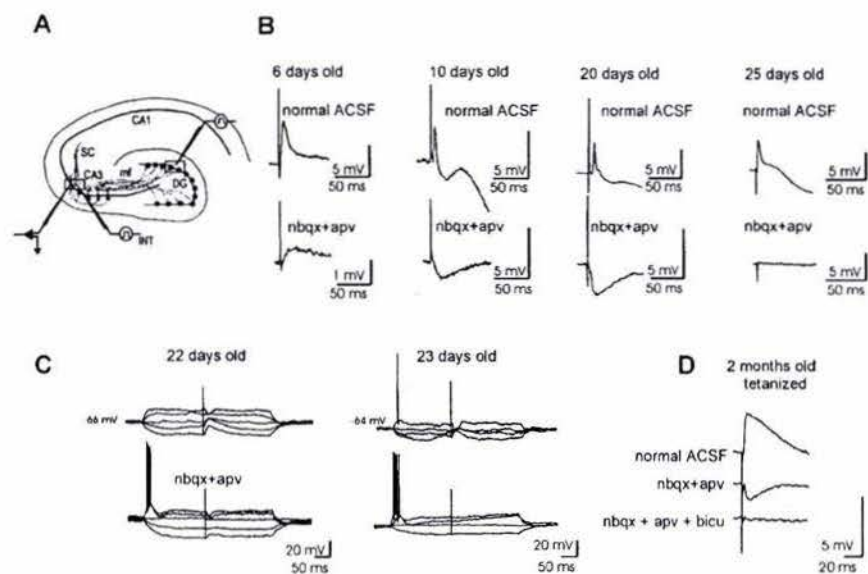


Figure 1. *A*, Sites of stimulation in the DG and recording in CA3c. *B*, Synaptic responses of pyramidal cells to DG activation at different ages before (normal ACSF) and after perfusion of NBQX plus APV show that MF-GABAergic transmission is transiently expressed during development. *C*, Synaptic responses evoked at different membrane potentials before and after NBQX plus APV show MF-GABAergic signaling at day 22 and its downregulation at day 23 of age. After this age, MF-GABAergic transmission is induced in an activity-dependent manner (*D*). Traces in *B* and *D* are an average of 10 responses.

Materials and Methods

We used Wistar rats of 6, 10, 15, 20, 22, 23, and 25 d and 1 and 2 months of age. Combined entorhinal cortex–hippocampus slices (400 μ m) were obtained and maintained at room temperature (22°C) in oxygenated artificial CSF (ACSF) containing the following (mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 MgSO_4 , 2 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , and 10 glucose, pH 7.35.

Electrophysiological experiments. After incubating the slices with ACSF at $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 1 hr in an air–liquid interface recording chamber, we recorded intracellular activity of pyramidal cells over area CA3a with glass microelectrodes (resistance, 60–80 M Ω ; filled with 2 M potassium acetate) (Fig. 1*A*). An AxoClamp 2B amplifier and pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA) were used for acquisition and analysis. For GC activation, single-pulse stimulation (duration of 0.1 msec) was delivered with a patch pipette (1 M Ω , filled with ACSF) over the GC layer of the DG (Fig. 1*A*), at an intensity that evoked an EPSP with 60–70% of the amplitude required to make the cell fire action potentials. For interneuron activation, a patch pipette was placed 200–300 μ m away from the recording electrode over the limit of the strata pyramidale and lucidum. To induce MF-GABAergic transmission in adult preparations, three 1 sec trains of 0.1 msec pulses at 100 Hz (intertrain interval of 1 min) were delivered every 15 min for 3 hr over the perforant path at an intensity at which test pulses provoked 50% of maximal field potential amplitude in the DG (Gutiérrez, 2002).

The drugs used were diluted in the ACSF: the NMDA receptor antagonist (DL)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) (30 μ M; Tocris Cookson, Ballwin, MO); the non-NMDA receptor antagonist 6-nitro-7-sulfamoylbenzo (f)quinoloxaline-2,3-dione (NBQX) (10 μ M; Tocris Cookson); the GABA_A receptor antagonist bicuculline methiodide (20 μ M) (Sigma, St. Louis, MO); and the group III metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist L(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP-4) (10 μ M; Tocris Cookson).

Immunohistological experiments. GAD₆₇ (glutamate decarboxylase 67 kDa isoform) and GABA immunoreactivity (IR) was analyzed in hippocampal slices of four animals of each age group as mentioned above plus a group of 24 d, as described previously (Ramírez and Gutiérrez, 2001). Briefly, slices were fixed in paraformaldehyde at 4% in PBS, cryoprotected in 30% sucrose, and then frozen and cut at 14 or 30 μ m in a cryostat at -20°C . They were incubated in the presence of rabbit GAD₆₇ antibody (1:1000; Chemicon, Temecula, CA) and then in the presence of

goat anti-rabbit IgG coupled to FITC (Vector FI-1000, 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Detection of GABA-IR was done with a rabbit polyclonal antibody (Sigma; A2052; 1:1000 dilution) and a donkey biotinylated anti-rabbit IgG (RPN 1004; 1:300 dilution) and further incubated with FITC-streptavidin (Zymed 43-4311; 1:200 dilution; Zymed, San Francisco, CA). Selected sections were analyzed (usually 14 optical sections of 1 μ m) with a scanning confocal microscope (MRC 1024; Bio-Rad, Hercules, CA). Images were acquired with an excitation wavelength of 488 nm (Confocal Assistant; Tood Clark Brelje), and a densitometric analysis was conducted (Metamorph Imaging System; Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) over two sites (CA3a and CA3b) of the stratum lucidum in four slices of each of three animals at 15, 22, 23, 24, and 30 d of age at high magnification (60 \times). Immunofluorescence, expressed in arbitrary units of pixel gray values, was averaged per age group and scaled for graphical representation with a minimal and maximal relative value at 30 and 15 d of age, respectively. For control purposes, each experiment included a slice processed in the absence of the primary antibody.

Vesicular GABA transporter mRNA analysis.

The semiquantitative determination of vesicular GABA transporter (VGAT) mRNA has been described previously (Lamas et al., 2001). In brief, it was analyzed by PCR coamplification with the endogenous internal standard gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) from the granular cell layer of the DG dissected from two 500- μ m-thick hippocampal slices from each of three rats at 6, 10, and 15 d and 2 months of age. The primer set for VGAT was designed to amplify bases 471–1120 of the rat coding sequence (McIntire et al., 1997). VGAT oligonucleotide primers were designed so as to bind to different exons allowing amplification products derived from cDNA and completely avoiding contaminating genomic DNA. The primer set that targets the constitutively expressed gene *HPRT* amplifies a 370 bp PCR fragment. Samples of the different age groups were processed simultaneously and blindly analyzed by triplicate. The number of PCR cycles was fixed to yield a constant *HPRT* signal in all groups for each experiment. After PCR, the DNA products were electrophoresed on 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide. They were placed on a UV transilluminator and photographed with Polaroid-type 667 instant film. Photographs were subjected to densitometric analysis using LabWorks 4.0 software (UVP, Upland, CA).

Results

Electrophysiological experiments

In 6-d-old preparations, pyramidal cells responded to DG activation with a monophasic depolarizing potential, which was partially blocked by NBQX plus APV ($n = 9$) (Fig. 1*B*). The remaining depolarizing component could be blocked by bicuculline ($n = 6$) (Fig. 2*A*). From day 10 of age on, DG stimulation provoked depolarizing and hyperpolarizing postsynaptic potential sequences (EPSP/IPSP) (Fig. 1*B*). On perfusion of NBQX plus APV, the EPSP was completely blocked and a fast bicuculline-sensitive IPSP was uncovered in all of the recorded cells from slices of 10-, 15-, and 20-d-old rats ($n = 90$) (Figs. 1*B*, 2*A*). The same responses were obtained in two electrophysiologically identified interneurons in a 10-d-old preparation (data not shown). The latencies of the pharmacologically isolated IPSPs for each age were not different from those of the corresponding control EPSPs. Thus, the mean latency difference of the EPSP and

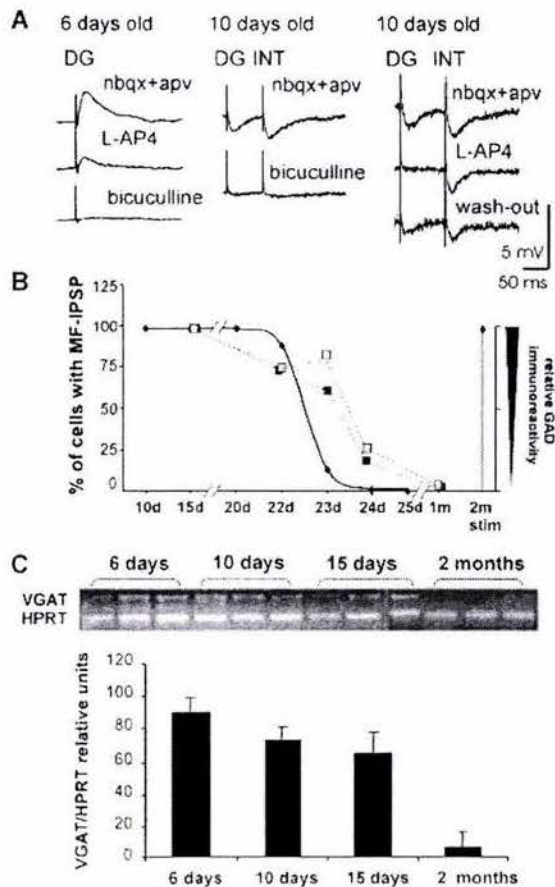


Figure 2. *A*, DG stimulation evokes bicuculline-sensitive monosynaptic depolarizing potentials at 6 d and hyperpolarizing responses at 10 d of age in pyramidal cells in the presence of NBQX plus APV. Contrary to responses of interneuronal (INT) origin, these responses are reversibly inhibited by L-AP4. Traces are an average of 10 responses. *B*, Percentage of pyramidal cells that responded with a fast IPSP to DG activation in the presence of NBQX plus APV at different ages (rhombuses). In adults, MF-GABAergic transmission can be induced in an activity-dependent manner (stim). GAD₆₇ immunoreactivity determined by densitometric analysis in CA3a (open squares) and in CA3b (filled squares) follows a similar trend. *C*, Expression of VGAT gene transcripts in the isolated DGs at the depicted ages. The bar graph shows the VGAT/HPRT ratio obtained from the whole series of experiments ($n = 3$ by triplicate), evidencing the expression of VGAT mRNA when MF-GABAergic transmission can be detected and its age-dependent downregulation.

GABAergic potential (0.13 ± 0.08 msec) was consistent with a monosynaptic contact, as determined by a one-way ANOVA test and Scheffé post-ANOVA contrast (6 d, $F = 1.1$; 10 d, $F = 1.0$; 15 d, $F = 1.04$; 20 d, $F = 1.4$; 22 d, $F = 1.4$; $p < 0.05$). The reversal potential of the bicuculline-sensitive depolarizing potential determined at 6 d was -46.5 ± 5.1 (mean resting membrane potential, -69.6 ± 1.8 mV; $n = 9$) and of the IPSPs in 10-, 15-, 20-, and 22-d-old rats was -68 ± 1.6 mV (mean resting membrane potential, -64.5 ± 1.2 mV; $n = 116$) (Fig. 1C). The rise time (10–90%) of the control EPSP for each age was as follows (in msec): 6 d, 9.11 ± 0.6 ; 10 d, 6.8 ± 0.6 ; 15 d, 5.6 ± 0.6 ; 20 d, 3.7 ± 0.4 ; 22 d, 3.2 ± 0.5 ; 23 d, 2.8 ± 0.6 . The rise time of the isolated MF-evoked IPSP was as follows (in msec): 6 d, 10.4 ± 1.3 ; 10 d, 8.8 ± 0.5 ; 15 d, 8.6 ± 0.6 ; 20 d, 7.8 ± 0.3 ; 22 d, 7.3 ± 0.1 . The group III mGluR agonist L-AP4, which selectively inhibits MF-GABAergic transmission, reversibly depressed the DG-evoked depolarizing potential (6-d-old rats) and the IPSP (10- to 22-d-old rats) by $83 \pm 4\%$, whereas the IPSP evoked in the same cells by direct stimulation of interneurons within CA3 was unaffected ($n = 47$) (Fig. 2A).

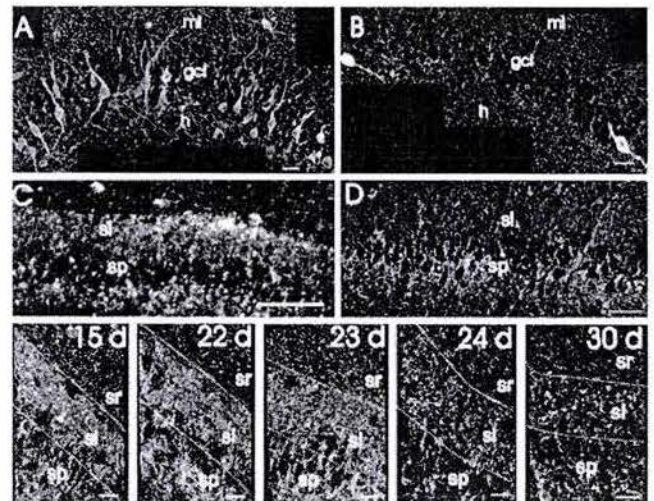


Figure 3. *A*, Confocal images show the presence of GABA-immunoreactive interneurons and cells with characteristics of GCs within the stratum granulosum (sg) of a 15-d-old preparation, whereas in adult preparations (*B*), only interneurons are visible in the molecular layer (ml) and in the border of the stratum granulosum and hilus (*h*). GAD₆₇-IR in the stratum lucidum (sl) of a 15-d-old (*C*) and a 2-month-old (*D*) preparation. The series of images below depicts GAD₆₇-IR in CA3b at the indicated ages. These preparations were simultaneously processed. A clear downregulation is apparent toward the third week of life, when GAD₆₇-IR is restricted to terminals around pyramidal cells (sp) and to a few in the stratum lucidum and stratum radiatum (sr). Scale bars: *A*, *B*, lower array, 25 μ m; *C*, *D*, 50 μ m.

After 25 d of age, synaptic responses provoked by DG stimulation were completely blocked by NBQX plus APV ($n = 150$) (Fig. 1B, C). To determine the time at which the monosynaptic MF-GABAergic responses disappear, we recorded from 22- and 23-d-old rats. At age 22 d, 26 of 29 cells, and at age 23 d, 4 of 30 cells responded with a monosynaptic IPSP to MF activation during glutamatergic blockade, indicating that this response shuts off in a clear-cut manner (Figs. 1C, 2B). Because MF-GABAergic transmission can be induced in an activity-dependent manner in adult rats (Gutiérrez, 2002), we recorded from pyramidal cells of slices subjected to the induction protocol (see Materials and Methods) and corroborated that NBQX plus APV blocked the EPSP evoked by GC activation, isolating monosynaptic GABAergic responses in 30 of 30 cells tested (Fig. 1D).

VGAT mRNA expression

Because the activity-dependent expression of MF-GABAergic transmission correlated with that of VGAT mRNA in adult rats (Lamas et al., 2001), we explored its level of expression in the DG of developing rats. We found that, at the ages when MF-GABAergic transmission is detected (6, 10, and 15 d), a steady expression of the VGAT mRNA was observed in all of the rats of each age group. In contrast, in the DG of young adult rats (2 months old), in which GABAergic transmission is not observed, VGAT mRNA is barely detected (Fig. 2C).

Immunohistological experiments

In slices of 6-, 10-, 15-, and 20-d-old rats, GABA-immunoreactive cells with characteristics of GCs were detected within the stratum granulosum of the DG (Fig. 3A). They had a round cell body, with a defined big nucleus and dendritic projections toward the stratum moleculare of the DG and the putative axonal projection toward the hilus. Although GABA-immunoreactive cells were detected along the whole extension of the stratum granulare, not all cells were GABA immunoreactive.

Also, basket cells in the inner layer of the DG and interneurons in the hilar or molecular regions were apparent, which clearly differed in shape and orientation. In young adult rats, GABA-immunoreactive GCs were seldom detected, but interneurons in the hilus and stratum moleculare could be clearly observed (Fig. 3*B*). On the other hand, a clear GAD₆₇-IR was observed in the MF of developing rats that progressively diminished with age (Figs. 2*B*, 3). From approximately day 24–25, GAD₆₇-immunoreactive terminals were observed around pyramidal cells of CA3, but staining of the stratum lucidum was barely seen (Fig. 3*D*). The control slices that were processed in the absence of the primary antibody did not present immunoreactivity (data not shown).

Discussion

We show that the “normally glutamatergic” GCs transiently express a functional GABAergic phenotype during development and after the establishment of hyperexcitability in the adult. A low expression of GAD₆₇, GABA, and VGAT mRNA is normally found in GCs and their terminals (Sandler and Smith, 1991; Sloviter et al., 1996; Lamas et al., 2001), and seizures (Schwarzer and Sperk., 1995; Lehmann et al., 1996; Sloviter et al., 1996; Lamas et al., 2001; Gómez-Lira et al., 2002) or LTP-like stimulation (Lamas et al., 2001; Ramírez and Gutiérrez, 2001) upregulate their expression. Accordingly, activity- and protein synthesis-dependent induction of monosynaptic MF-GABAergic signaling onto CA3 is observed (Gutiérrez, 2000, 2002; Gutiérrez and Heinemann, 2001; Gutiérrez, 2002; Romo-Parra et al., 2003). Also, in agreement with the idea that GCs release GABA, Walker et al. (2001) showed monosynaptic MF-GABAergic transmission to be normally present in slices from young guinea pigs. These results, however, were in conflict with our previous results in that no activity-dependent mechanisms seem to be involved in MF-GABAergic transmission. With our present evidence, we show that the developmental stage is the determining factor underlying these apparent conflicting results and establish that developmental and activity-dependent mechanisms underlie this phenomenon.

Our electrophysiological evidence demonstrates that fast mGluR-sensitive GABAergic transmission can be evoked in CA3 by MF activation at early ages. On day 6 of age, MF activation evokes an NBQX plus APV-insensitive depolarizing response that can be blocked by bicuculline and whose reversal potential coincides with GABAergic responses at this age (Ganguly et al., 2001). Thereafter, MF activation provokes hyperpolarizing GABAergic responses that disappear in a clear-cut manner on day 23–24 of age. Both the early depolarizing and hyperpolarizing MF-GABAergic potentials are strongly inhibited by the type III mGluR agonist L-AP-4, which presynaptically inhibits MF-GABAergic transmission (Gutiérrez, 2000, 2002; Walker et al., 2001; Romo-Parra et al., 2003). This is a reliable test to identify neurotransmission of MF origin because these receptors are located in MF terminals (Ohishi et al., 1995). On the other hand, GABAergic responses of interneuronal origin are not affected by mGluR activation (Walker et al., 2001; Romo-Parra et al., 2003). Additional investigation is needed to establish whether glutamate and GABA are released from the same MF terminal and how the proportion of release of both amino acids varies during development.

The release of GABA from MF in the developing rat has possibly been observed (Ben-Ari et al., 1989) but not identified as such. In developing rats, giant synchronous discharges appear that are primarily mediated by GABA_A receptors and by MF synaptic input. Interestingly, the selective lesion of the DG blocks

most of the excitatory drive to these cells (Henze et al., 1997), suggesting that MF-GABAergic input can be disrupted. Activation of GABA and glutamate receptors happens in synergy in developing rats, because a strong excitatory drive is needed to activate NMDA receptors (Leinekugel et al., 1997). Therefore, it is tempting to speculate that MF-GABAergic transmission possibly contributes to the development of CA3 neurons. Interestingly, the clear-cut shut off of MF-GABAergic responses happens on day 22–23, 2 weeks after GABA has ceased to exert depolarizing actions. This suggests that MF-GABAergic transmission accompanies the morphological maturation of pyramidal cells possibly until the completion of the development of dendrites and spines, which happens at approximately the same time (Ben-Ari, 2001).

In direct correspondence, VGAT mRNA is expressed in the DG of young animals but barely detected when MF-GABAergic transmission is no longer observed. However, MF-GABAergic transmission reappears when hyperexcitability is induced and VGAT mRNA expression is, therefore, upregulated (Lamas et al., 2001). Also, contrary to adult preparations, GABA-immunoreactive putative GCs are detected in the DG, and GAD₆₇ is clearly observed in the MF of young animals. In our analysis, although some GABA-immunoreactive cells are likely to be basket cells (Ribak and Seress, 1983, 1988), some cells with typical features of GCs are GABA immunoreactive. Granule cells originated at different postnatal ages coexist (Gaarskjaer, 1985), and it seems probable that the younger GCs in the adult, which lie in the inner portion of the GC layer in the developing rat (Altman and Bayer, 1990), are those that express GABAergic markers. It is suggestive that MF innervation of CA3 neurons seems to be more abundant during development and MF extensions are longer by day 14 than in the mature animal (Amaral and Dent, 1981). This could explain why not all GCs need to express GABA. More indicative for the GABAergic phenotype of the MF pathway was its clear GAD₆₇-IR observed in the young animals and its downregulation at approximately the same time when DG-to-CA3 disynaptic inhibition is established. Dupuy and Houser (1996) have shown a shift in the intracellular distribution of GAD₆₇ from cell bodies to terminal-like structures at late prenatal to early postnatal ages and have suggested that the GAD₆₇-containing terminal-like structures identified early in life, adjacent to the pyramidal layer in CA3, are likely to be the source of GABA for developmental functions. Finally, for MF-GABAergic transmission to occur, GABA_A receptors must be in the subsynaptic site. Interestingly, in cultured pyramidal cells, GABA_A receptors cluster apposed to glutamatergic presynaptic elements, suggesting the hypothesis that there is an element common to GABA and glutamate synapses (Rao et al., 2000). It is therefore likely that pyramidal cells do normally have GABA receptors in apposition to MF inputs, which explains why fast MF-GABAergic synaptic responses can be normally seen in the developing rat and induced in the adult.

The developmental plasticity of MF-GABAergic transmission that we have evidenced reflects the suggested transient expression of the GABAergic phenotype of cells within the DG at early ages (Dupuy and Houser, 1996, 1997). This, together with data showing a sequential formation of functional GABA_A and glutamatergic synapses (Hennou et al., 2002), put our data in a developmentally relevant perspective. We propose that the complex expression of GC phenotype contributes to developmental and protective functions. This idea has received increasing support and proves that the phenotypic plasticity is put in play in response to environmental influences (Cao et al., 1996). The enhanced excitability of a GABA-releasing MF pathway goes in line with the

protection of principal cells in the hippocampus (Holmes et al., 1999; Haas et al., 2001) and hilar neurons of young animals (Ribak and Navetta, 1994), which in general are less prone to the deleterious effects of seizures.

References

- Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 301:365–381.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus. I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51–86.
- Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 190:115–134.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353–360.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 416:303–325.
- Ben-Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL (1994) gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog Brain Res* 102:261–273.
- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated "ménage à trois." *Trends Neurosci* 20:523–529.
- Cao Y, Wilcox KS, Martin CE, Tachinsky TL, Eberwine J, Dichter MA (1996) Presence of mRNA for glutamic acid decarboxylase in both excitatory and inhibitory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9844–9849.
- Dupuy ST, Houser CR (1996) Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. *J Neurosci* 16:6919–6932.
- Dupuy ST, Houser CR (1997) Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *J Comp Neurol* 389:402–418.
- Gaarskjaer FB (1985) The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *J Comp Neurol* 241:154–170.
- Gaiarsa JL, McLean H, Congar P, Leinekugel X, Khazipov R, Tseeb V, Ben-Ari Y (1995) Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid-A and B-mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *J Neurobiol* 26:339–349.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521–532.
- Gómez-Lira G, Trillo E, Ramírez M, Asai M, Sitges M, Gutiérrez R (2002) Expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse coincides with the seizure-induced expression of GABA in mossy fiber synaptosomes. *Exp Neurol* 177:276–283.
- Gutiérrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic neurotransmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84:3088–3090.
- Gutiérrez R (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87:2562–2570.
- Gutiérrez R, Heinemann U (2001) Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus—CA3 projection. *Eur J Neurosci* 13:1371–1379.
- Haas KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK, Moshe SL (2001) Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* 11:615–625.
- Henou S, Khalilov I, Diabira D, Ben-Ari Y, Gozlan H (2002) Early sequential formation of functional GABA and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* 6:197–208.
- Henze DA, Card JP, Barrionuevo G, Ben-Ari Y (1997) Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J Neurophysiol* 77:1075–1086.
- Holmes GL, Sarkisian M, Ben-Ari Y, Chevassus-Au-Louis N (1999) Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. *J Comp Neurol* 404:537–553.
- Lamas M, Gómez-Lira G, Gutiérrez R (2001) Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Mol Brain Res* 93:209–214.
- Lehmann H, Ebert U, Löscher W (1996) Immunocytochemical localization of GABA immunoreactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats. *Neurosci Lett* 212:41–44.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243–255.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870–876.
- Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1995) Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* 360:555–570.
- Ramírez M, Gutiérrez R (2001) Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 917:139–146.
- Rao A, Cha EM, Craig AM (2000) Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:8344–8353.
- Ribak CE, Navetta MS (1994) An immature mossy fiber innervation of hilar neurons may explain their resistance to kainite-induced cell death in 15-day-old rats. *Dev Brain Res* 79:47–62.
- Ribak CE, Seress L (1983) Five types of basket cells in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:577–597.
- Ribak CE, Seress L (1988) The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 44:197–209.
- Romo-Parra H, Vivar C, Maqueda J, Morales MA, Gutiérrez R (2003) Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3. *J Neurophysiol* 89:3155–3167.
- Sandler R, Smith AD (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 303:177–192.
- Schwarzer C, Sperk G (1995) Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase 67 after limbic seizure in the rat. *Neuroscience* 69:705–709.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373:593–618.
- Walker MC, Ruiz A, Kullmann DM (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29:703–715.

TABLA 5.1

	Control	Post-crisis
	Media+/-e.e.	Media+/-e.e.
Resistencia de entrada (MΩ)	37+/-2 (n =25)	38+/-1 (n =93)
Potencial de membrana en reposo (mV)	-63+/-2 (n =25)	-64+/-1 (n =93)
Duración del potencial de acción (ms)	1.3+/-0.02 (n =20)	1.4+/-0.02 (n =20)
Amplitud de AHP (mV)	5.4+/-1.0 (n =20)	4.8+/-1.5 (n =20)*
Duración de la AHP (ms)	6.2+/-0.2 (n =20)	6.4+/-0.3 (n =20)
DG-EPSP amplitud (mV)	4.6+/-0.4 (n =30)	6.3+/-0.2 (n =93) *
DG-EPSP latencia (ms)	4.5 +/-0.2 (n =30)	4.4+/-0.8 (n=93)
DG-EPSP tiempo al pico (ms)	14+/-0.2 (n =30)	12.9+/-0.4 (n=93)
DG-EPSP tiempo de subida (10-90%; ms)	2.5+/-0.2 (n =30)	3.9+/-0.3 (n =93) *
DG-IPSP amplitud (mV)	--	3.4+/-0.4 (n =25) **
DG-IPSP latencia (ms)	--	4.3+/-0.3 (n=25)
DG-IPSP tiempo al pico (ms)	--	19+/-0.1 (n=25) **
DG-IPSP tiempo de subida (10-90%; ms)	--	14.0+/-1.2 (n =25) **
DG-IPSP potencial de inversión	--	-67+/-0.7 (n=25)
DG-sEPSP latencia (ms)	--	6.1+/-0.2 (n =93)
DG-sEPSP amplitud (mV)	--	1.8+/-0.1 (n =93)
DG-sEPSP duración (ms)	--	137+/-5 (n =93)
DG-sEPSP tiempo de subida (10-90%; ms)	--	20.5+/-0.1 (n =93)
DG-IPSP amplitud (mV; con antagonistas colinérgicos.)	--	6.8+/-0.8 (n=9) **
DG-IPSP tiempo al pico(ms; con antagonistas colinérgicos)	--	11.2+/-0.2 (n=9) **
DG-IPSP tiempo de subida (10-90%; ms; con antagonistas colinérgicos)	--	7+/-0.1 (n=9) **
A/C-sEPSP latencia (ms)	7.3 +/-0.02 (n=3)	4.6+/-0.01 (n =15)
A/C-sEPSP amplitud (mV)	1.6 +/- 0.5 (n=3)	1.9+/-0.02 (n =15)
A/C-sEPSP duración (ms)	98.3 +/-2.8 (n=3)	113.9+/-2.4 (n =15)
A/C-sEPSP tiempo de subida (10-90%; ms)	17.9 +/- 2.4 (n=3)	18.4+/-0.1 (n =15)

TABLA 5.2		P6		P10		P15		P20		P22		P23		P25	
N=	1/1		14/15		15/15		9/9		26/29		4/30		0/10		
Lugar de estimulación	Media +/- E.E.		Media +/- E.E.		Media +/- E.E.		Media +/- E.E.		Media +/- E.E.		Media +/- E.E.		Media +/- E.E.		
	dg	int	dg	int	dg	int	dg	int	dg	int	dg	int	dg	int	
Resistencia de entrada (MΩ)	62.8		69.92 +/- 2		58.16 +/- 1.2		47.82 +/- 0.67		46.72 +/- 0.2		46.72 +/- 1.03		38.4 +/- 2		
Potencial de membrana en reposo (mV)	-65		-64.17 +/- 0.7		-61.43 +/- 1.0		-66.0 +/- 1.2		-64.7 +/- 1.1		-65 +/- 0.7		-64 +/- 2		
Control amplitud (mV)	5.04	6.5	8.17 +/- 0.03	7.30 +/- 0.2	2.95 +/- 0.38	1.85 +/- 0.11	4.29 +/- 0.2	4.62 +/- 0.3	2.76 +/- 0.01	9.93 +/- 0.01	2.65 +/- 0.9	2.08 +/- 0.56	4.5 +/- 0.4	3.4 +/- 0.01	
Control latencia (ms)	3	2	3.6 +/- 0.37	3.4 +/- 0.11	3.53 +/- 0.065	3.3 +/- 0.02	4.5 +/- 0.01	3.6 +/- 0.02	4 +/- 0.01	1.9 +/- 0.01	3.48 +/- 0.01	3.5 +/- 0.03	4 +/- 0.34	3.2 +/- 0.5	
Control tiempo al pico (ms)	9	8	17.76 +/- 0.48	19.58 +/- 0.2	16.27 +/- 0.014	8.2 +/- 0.03	9.2 +/- 0.07	8.5 +/- 0.01	12.6 +/- 0.02	13.5 +/- 0.03	11.7 +/- 0.89	12.4 +/- 0.77	13.98 +/- 1.3	12.3 +/- 0.6	
Control tiempo de subida (10-90%, ms)	13.72	11.6	16.62 +/- 0.22	19.82 +/- 0.9	10.32 +/- 0.86	11.18 +/- 1.47	4.44 +/- 0.04	12.5 +/- 0.02	10.52 +/- 1.1	8.19 +/- 1.02	1.76 +/- 0.21	2.30 +/- 0.43	16.5 +/- 0.2	14.02 +/- 1.0	
IPSP amplitud (mV)	0.39	0.48	4.11 +/- 0.25	4.18 +/- 2.02	5.17 +/- 0.15	1.965 +/- 14	2.93 +/- 0.04	1.85 +/- 0.3	2.03 +/- 0.02	1.69 +/- 0.03					
IPSP latencia (ms)	4.5	3	3.74 +/- 0.51	2.83 +/- 0.63	3.75 +/- 0.312	3.175 +/- 0.18	5.0 +/- 0.03	3.8 +/- 0.1	5.25 +/- 0.3	4.75 +/- 0.01					
IPSP tiempo al pico (ms)	29.5	35.5	19.58 +/- 4.4	12.31 +/- 0.54	12.1 +/- 0.16	13.125 +/- 0.37	14.75 +/- 0.1	15.25 +/- 0.04	10.7 +/- 0.2	9.83 +/- 0.01					
IPSP tiempo de subida (10-90%, ms)	11.6	12.1	19.83 +/- 0.62	21.16 +/- 10.04	16.8 +/- 0.4	18.3 +/- 0.07	14 +/- 0.1	10.65 +/- 0.02	5.3 +/- 0.1	4.32 +/- 0.02					
IPSP potencial de inversión			-67.8 +/- 2.1		-66.2 +/- 1.3		-70.13 +/- 1.2		-67.4 +/- 1.0						
Bajo nbqx+apv Resistencia de entrada (MΩ)			-65.64 +/- 0.9		-68.84 +/- 0.3		-44.0 +/- 0.8		-45.13 +/- 0.3		-66.2 +/- 0.2		-63.15 +/- 0.3		

CAPITULO 6

RESULTADOS

Respuesta sináptica de las células piramidales a la activación de las fibras musgosas (FM) en preparaciones de animales control.

Respuestas típicas de células piramidales de CA3 a pulsos despolarizantes muestran una ráfaga de dos o tres potenciales de acción seguidos de una hiperpolarización post-potencial (AHP; figura 5.1-C). Las características del potencial de acción, el potencial de membrana en reposo y la resistencia de entrada de las células de preparaciones control y PTZ se muestran en la Tabla 5.1.

La estimulación del GD provocó en células piramidales de CA3 una secuencia de EPSP/IPSPs que es completamente bloqueada por la perfusión de antagonistas a los receptores *N*methyl-D-aspartato (NMDA) y no NMDA. Sólo en 3 células se encontró que esta misma estimulación produjo un IPSP polisináptico que también es bloqueado por APV y NBQX (figura 5.1-D). En estas condiciones, la estimulación del GD no produjo respuestas sinápticas en las células piramidales a diferentes potenciales de membrana (Fig. 5.1-E). Los valores de amplitud, latencia, tiempo al pico y tiempo de subida de los EPSP monosinápticos control de células piramidales se encuentran concentrados en la tabla 5.1.

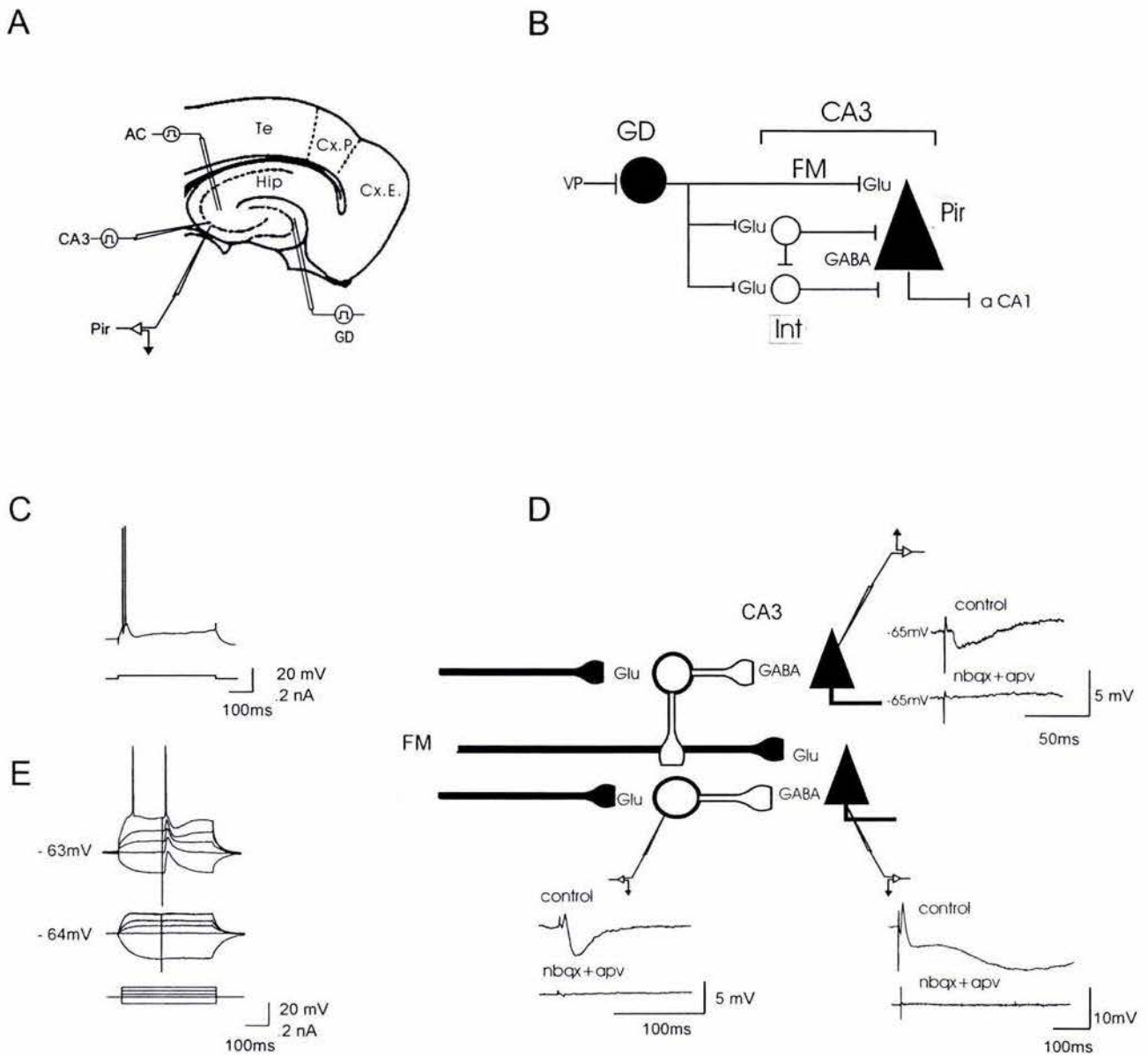


Fig. 5.1. Las fibras musgosas hacen contacto monosináptico con células piramidales e interneuronas intrínsecas en CA3 las cuales a su vez inhiben a las células piramidales. A: Representación esquemática del arreglo experimental donde se muestra los sitios de registro y estimulación. B: Representación esquemática de la proyección giro dentado-CA3. C: Respuesta de una célula piramidal a un pulso despolarizante. D: Representación esquemática del arreglo de las fibras musgosas (FM) y respuestas sinápticas a la estimulación del giro dentado (GD) de cada tipo celular. La estimulación del GD provoca, tanto en células piramidales como en interneuronas, potenciales postsinápticos excitadores monosinápticos (EPSP) seguidos de potenciales postsinápticos inhibitorios polisinápticos (ISPS's). La perfusión de antagonistas a receptores al glutamato bloquea todas las respuestas. E: Respuestas sinápticas de una célula piramidal a la estimulación del GD a diferentes potenciales de membrana en condiciones control (arriba) y con el bloqueo de la transmisión glutamatérgica (abajo). Al bloquear la transmisión glutamatérgica la estimulación del GD no evoca respuesta alguna. Potencial de membrana en reposo -65mV. Trazos en D son un promedio de 6-10 respuestas sinápticas. ABR: Te=tectum, Cx P= corteza piriforme, Cx E = corteza entorrinal, Hip.=hipocampo, AC=vía asociativa/comisural, Pir.=piramidal, INT= interneurona, VP=vía perforante, Glu=glutamato

La activación de las fibras musgosas produce respuestas monosinápticas GABAérgicas en células piramidales después de crisis convulsivas.

En rebanadas obtenidas de ratas a las que se les produjo una crisis convulsiva por la aplicación de PTZ, la estimulación del GD provocó una secuencia de EPSP/IPSPs (figura 5.2-A). Los valores para la amplitud, latencia, tiempo al pico y tiempo de subida del EPSP se encuentran concentrados en la tabla 5.1.

Comparados con las preparaciones control la amplitud del AHP es menor para el grupo con crisis convulsivas. La amplitud y el tiempo de subida del potencial sináptico glutamatérgico son mayores en el grupo PTZ. Las diferencias son estadísticamente significativas (t-student $P < 0.01$). La resistencia de entrada en condiciones control y con NBQX+APV de preparaciones control y PTZ no se modifica (figura 5.2-D).

A diferencia de las preparaciones control, la activación de las FM en presencia de NBQX y APV provocó un IPSP rápido (figura 5.2-A) cuya latencia fue de 4.3 ± 0.3 ms ($n=25$). La latencia del IPSP aislado no es diferente a la que corresponde al EPSP control (ANOVA de una vía y post-hoc Scheffé $P < 0.01$; $F = 0.07$) y la variabilidad de la latencia del IPSP (tanto como la del EPSP) para cada neurona es consistente con un contacto monosináptico ($F = 2.5$) (figura 5.2-A). Los valores para la amplitud, latencia, tiempo al pico y tiempo de subida de los IPSP evocados por la estimulación de las FM (FM-IPSP) de células piramidales se encuentran concentrados en la tabla 5.1. El potencial de inversión de los IPSP (-67 ± 0.7 mV; $n = 25$) y su bloqueo con bicuculina es consistente con los reportados para las respuestas GABAérgicas (figura 5.2-C). La resistencia de entrada de las células

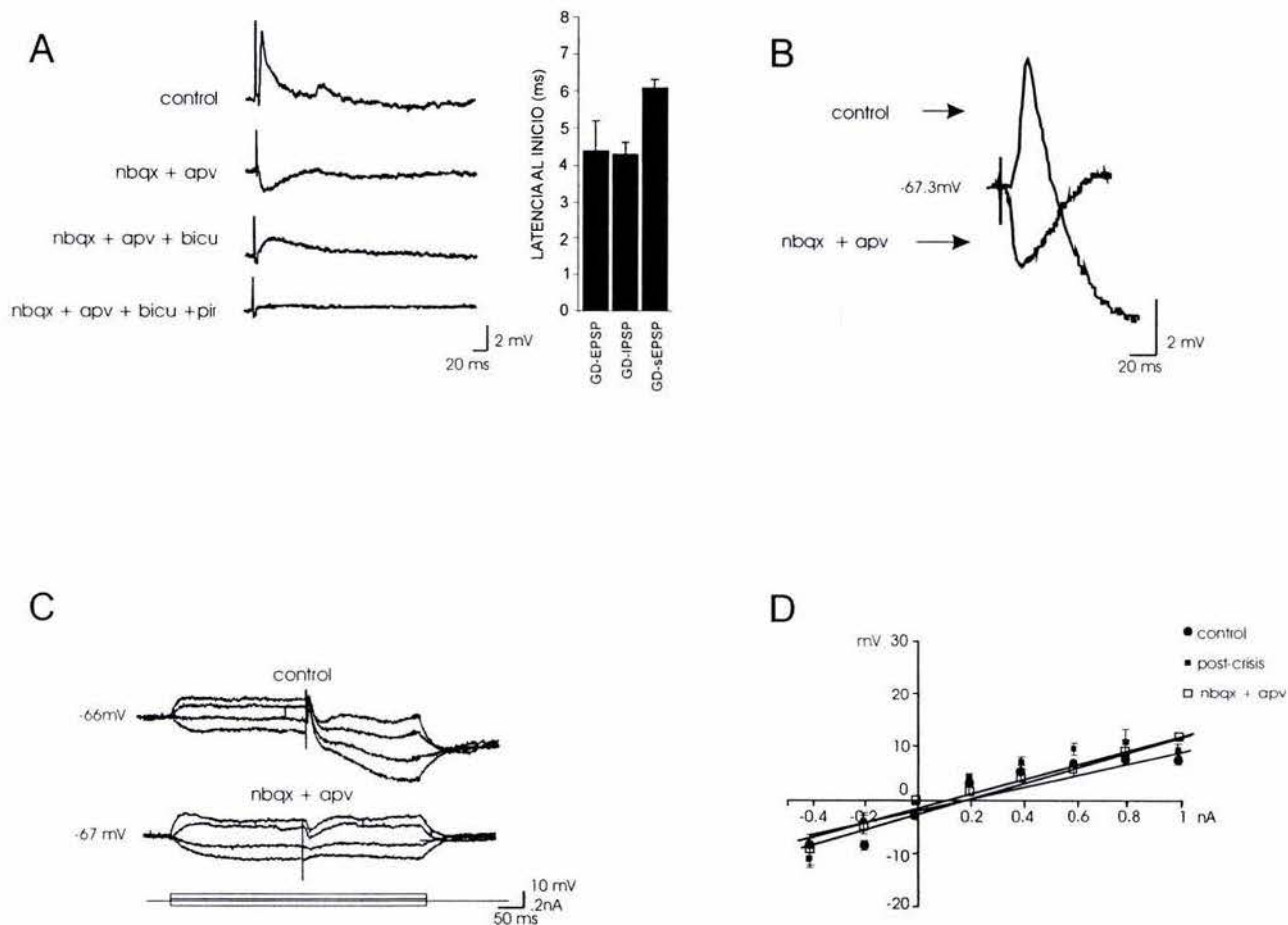


Fig. 5.2. Crisis convulsivas generalizadas producen respuestas GABAérgicas y colinérgicas en las células piramidales por la estimulación del giro dentado. A: Secuencia de respuestas sinápticas a la estimulación del giro dentado (GD) y su caracterización farmacológica (izquierda); histograma de frecuencias que representa la medición de las latencias al inicio de los potenciales postsinápticos (derecha). B: trazos superpuestos de las respuesta sinápticas rápidas en condiciones control y después del bloqueo de la transmisión glutamatérgica. C: Respuestas mono- y polisinápticas evocadas por la estimulación del GD a diferentes potenciales de membrana en condición control (arriba). Después del bloqueo de la transmisión glutamatérgica (abajo) se observa un IPSP de corta latencia cuyo potencial de inversión coincide con el potencial de inversión para el GABA. D: Gráfica del voltaje en función de la corriente con diferentes condiciones farmacológicas. La resistencia de entrada de la célula no se modifica (n=50). Trazos en A y B son promedios de 6-10 respuestas sinápticas.

piramidales en condiciones control y con bloqueo de la transmisión glutamatérgica no se modifica (control y PTZ; figura 5.2-D).

La estimulación del GD provocó respuestas colinérgicas en CA3 después de crisis convulsivas.

En contraste con las rebanadas control, en las preparaciones de animales a los cuales se les indujo una crisis convulsiva se observó que la estimulación del GD, en presencia de NBQX, APV y bicuculina, produjo un potencial postsináptico excitador lento (sEPSP) (figura 5.2-A; 5.3-A) que se bloqueó con atropina (10 μ M; n = 40), pirenzepina (10 μ M; n = 50), y MT7 (100 nM; n =6) (figura 5.3 A-D). Los valores para la amplitud, latencia, tiempo al pico y tiempo de subida de los sEPSP evocados por la estimulación de las FM de células piramidales se encuentran concentrados en la tabla 5.1. Al incrementar la estimulación el sEPSP se incrementa pero no produce potenciales de acción (no mostrado). El sEPSP no se pudo invertir a potenciales de membrana despolarizantes (figura 5.3-C)

Posteriormente se comparó el sEPSP evocado por la estimulación del GD con los evocados por la estimulación de las fibras asociativas-comisurales (A/C) (Vogt y Regehr, 2001). Los valores para la amplitud, latencia, tiempo al pico y tiempo de subida de los sEPSP evocados por la estimulación de las A/C se encuentran concentrados en la tabla 5.1. La figura 5.4 muestra el arreglo experimental y las respuestas a la estimulación del GD y de A/C. En rebanadas de animales control la perfusión de antagonistas a receptores al glutamato bloqueó todas las respuestas evocadas por la estimulación del GD. Bajo este mismo bloqueo, y en la

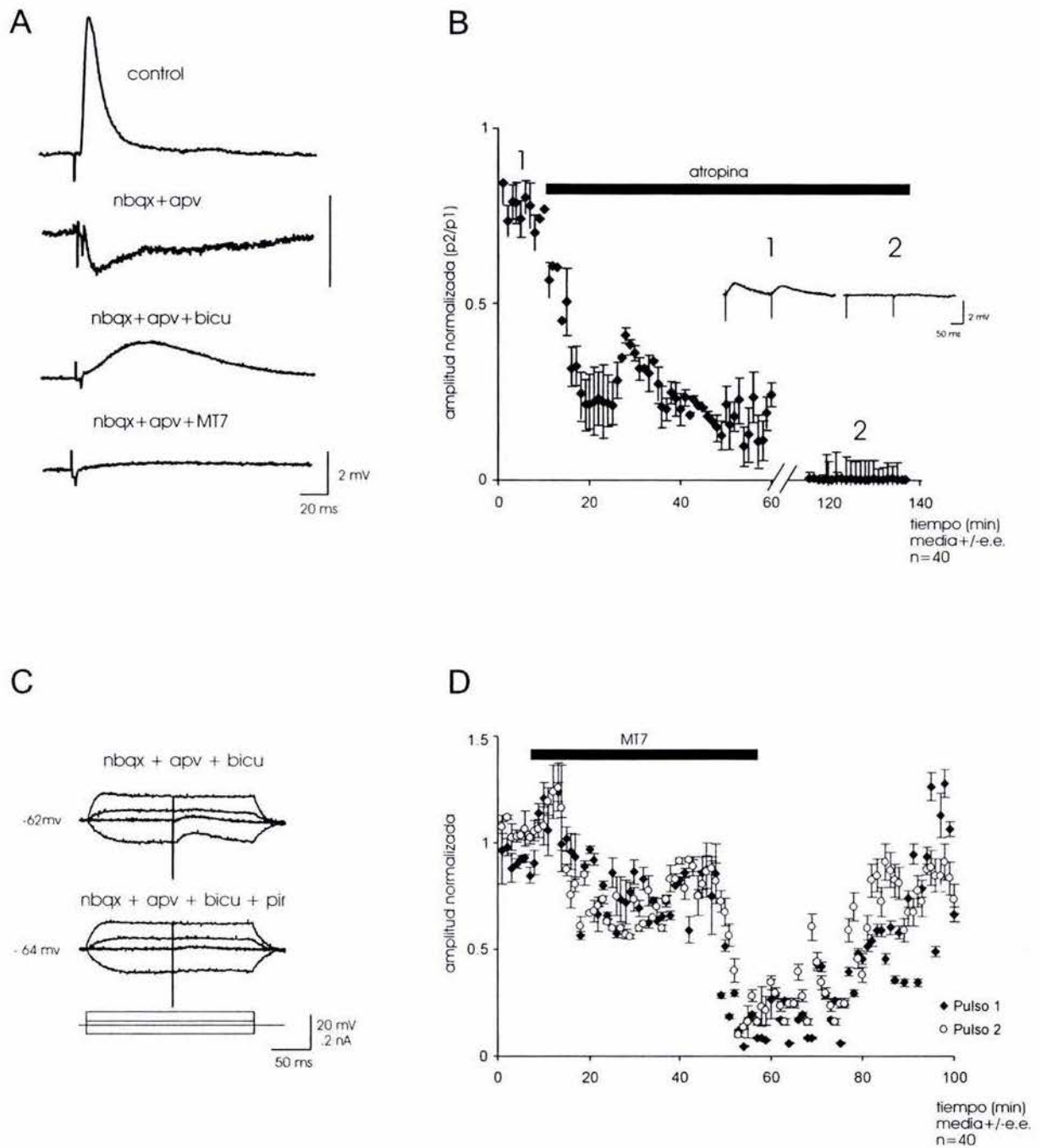


Fig. 5.3. El bloqueo de la transmisión glutamatergica y GABAérgica aisla un potencial excitador lento (sEPSP) evocado por la estimulación del giro dentado que es de naturaleza colinérgica. A: Secuencia de respuestas sinápticas a la estimulación del GD y su caracterización farmacológica. Nótese que el sEPSP es bloqueado por un antagonista selectivo a los receptores M1 (MT7). B: Curso temporal del bloqueo del sEPSP por atropina; (recuadro) respuestas colinérgicas evocadas por la estimulación del GD C: sEPSP a diferentes potenciales de membrana (arriba) y su bloqueo por pirenzepina (abajo). D: Curso temporal del bloqueo del mEPSP por MT7. El efecto es reversible. Trazos en A y B son promedios de 6-10 respuestas sinápticas. Gráficas en B y D se expresan en media +/- error estándar. Los trazos son promedio de 6-10 respuestas sinápticas.

misma preparación, la estimulación de A/C produjo una secuencia de IPSP's, rápido ($GABA_A$) y lento ($GABA_B$), estas respuestas GABAérgicas son producto de la estimulación de interneuronas locales de CA3. Tras el bloqueo de la transmisión GABAérgica la estimulación del GD no evocó respuesta alguna, sin embargo, las estimulación de A/C provocó un sEPSP que se bloqueó con pirenzepina (figura 5.4-B). Por el contrario en rebanadas de preparaciones de animales con PTZ y en presencia de antagonistas al glutamato y GABA la estimulación del GD y la de A/C evocaron un sEPSP (figura 5.4-C). Los antagonistas a receptores M1: atropina (10 μ M; n = 40), pirenzepina (10 μ M; n = 50), y MT7 (100 nM; n =6) bloquearon los sEPSP's evocados por la estimulación, tanto, del GD como A/C lo que confirma que estas respuestas están mediadas por receptores muscarínicos M1 (figura 5.4-C). Pulsos de corriente aplicados durante el sEPSP produjeron un incremento de la resistencia de entrada de las células piramidales del 39 ± 7 % (n= 5; figura 5.4-D).

Para determinar si el bloqueo de los receptores muscarínicos antes del bloqueo de la transmisión GABAérgica altera el IPSP evocado por la activación de las FM se perfundió antagonistas colinérgicos en presencia de antagonistas a receptores ionotrópicos al glutamato. En estas condiciones, el IPSP de las FM provocado en las células piramidales incrementó su amplitud cuando se bloquearon los receptores M1. El valor del potencial de inversión en estas condiciones fue -72.4 ± 6 (n=9). Este valor coincide con el potencial de inversión para los potenciales GABAérgicos evocados por la estimulación directa de las interneuronas (-72 ± 0.8 mV; n = 10) donde no se reclutan fibras colinérgicas. Esto demuestra la interacción

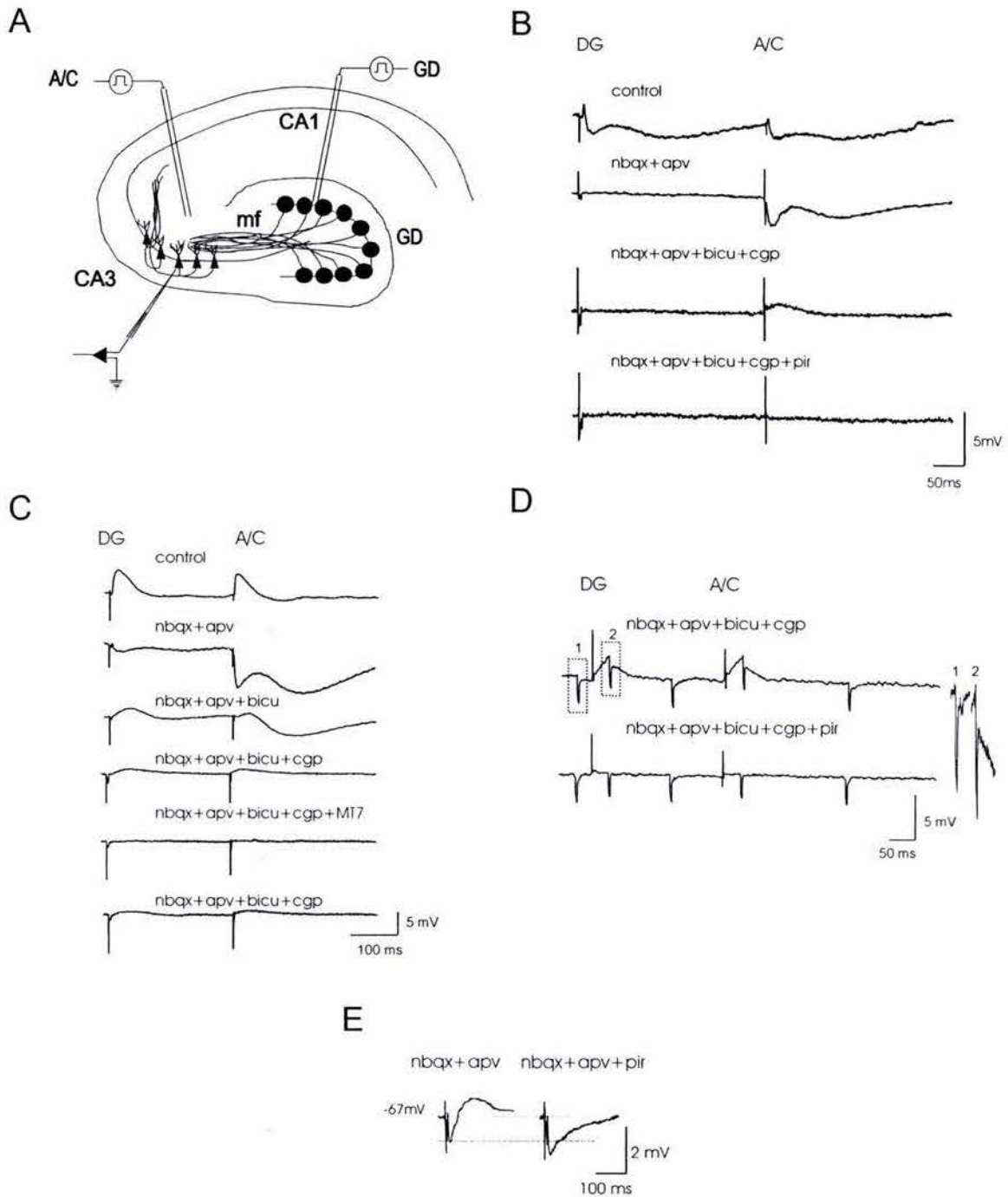


Fig. 5.4. Respuestas colinérgicas evocadas por la estimulación del giro dentado y la vía asociativa/comisural (A/C). Representación esquemática del hipocampo donde se muestran los sitios de registro y estimulación usados para activar el GD y la A/C. B: Respuestas sinápticas de células piramidales a la estimulación del GD y A/C de preparaciones control. La perfusión de antagonistas al glutamato bloquean todas las respuestas sinápticas evocadas por la estimulación del GD. La estimulación de A/C, en estas condiciones farmacológicas, evoca potenciales GABAérgicos debido a la estimulación de interneuronas cercanas al stratum radiatum. Después del bloqueo de receptores $GABA_A$ y $GABA_B$ se observa un sEPSP (A/C) que es bloqueado por pirenzepina. C: En preparaciones procedentes de ratas con una crisis convulsiva y con el bloqueo de la transmisión glutamatérgica ambas estimulaciones evocan IPSP's GABAérgicos. Al bloquear la transmisión GABAérgica la misma estimulación provoca sEPSPs que son bloqueados por MT7 y su efecto es reversible. D: Pulsos hiperpolarizantes demuestran que la resistencia de entrada de la célula se incrementa durante el sEPSP y este efecto es bloqueado por pirenzepina. E: Respuestas sinápticas evocadas en GD y bajo el bloqueo de transmisión glutamatérgica, nótese que después de la perfusión de un antagonista colinérgico se bloquea el sEPSP y se incrementa el IPSP. Trazos en B, C y D son promedios de 6-10 respuestas sinápticas

postsináptica de la señal colinérgica (figura 5.4-E) y la señal GABAérgica producto de la estimulación de las FM.

Modulación presináptica de las fibras musgosas y la vía asociativa/comisural.

La activación de receptores metabotrópicos al glutamato (mGluR) reduce la liberación de glutamato de las FM y ésta estrategia se usa para la identificación de señales provenientes de las FM (Manzoni y cols., 1995; Maccaferri y cols., 1998). Contrastamos el efecto de los agonistas a mGluR sobre las respuestas GABAérgicas provocadas por la estimulación de las FM y de interneuronas locales de CA3. Ambas respuestas fueron registradas y analizadas en la misma célula (ver arreglo experimental en la figura 5.1-A). El agonista para los mGluR-III, L-AP4, inhibió el FM-IPSP en 44 de 44 células registradas y no tuvo efecto sobre las respuestas inhibitoras evocadas por la estimulación directa de interneuronas (figura 5.5-A). En lo que respecta a la activación de mGluR-II, el efecto del agonista sobre el FM-IPSP fue menor (26%) que el del LAP-4 (84%) (figura 5.5-C). Al perfundir LAP-4 durante el máximo efecto del DCG-IV se inhibió el FM-IPSP (84%; n=11; figura 5.5-C). Debido a que el LAP-4 deprime las respuestas GABAérgicas procedentes de las fibras musgosas este agonista, en presencia de antagonistas a los receptores del glutamato, deberá deprimir el MF-ISPS y aislar el sEPSP sólo si este último no es sensible al LAP-4. Como se muestra en la figura 5.5-B el LAP-4 bloqueó el FM-IPSP sin alterar el sEPSP (91% n= 4).

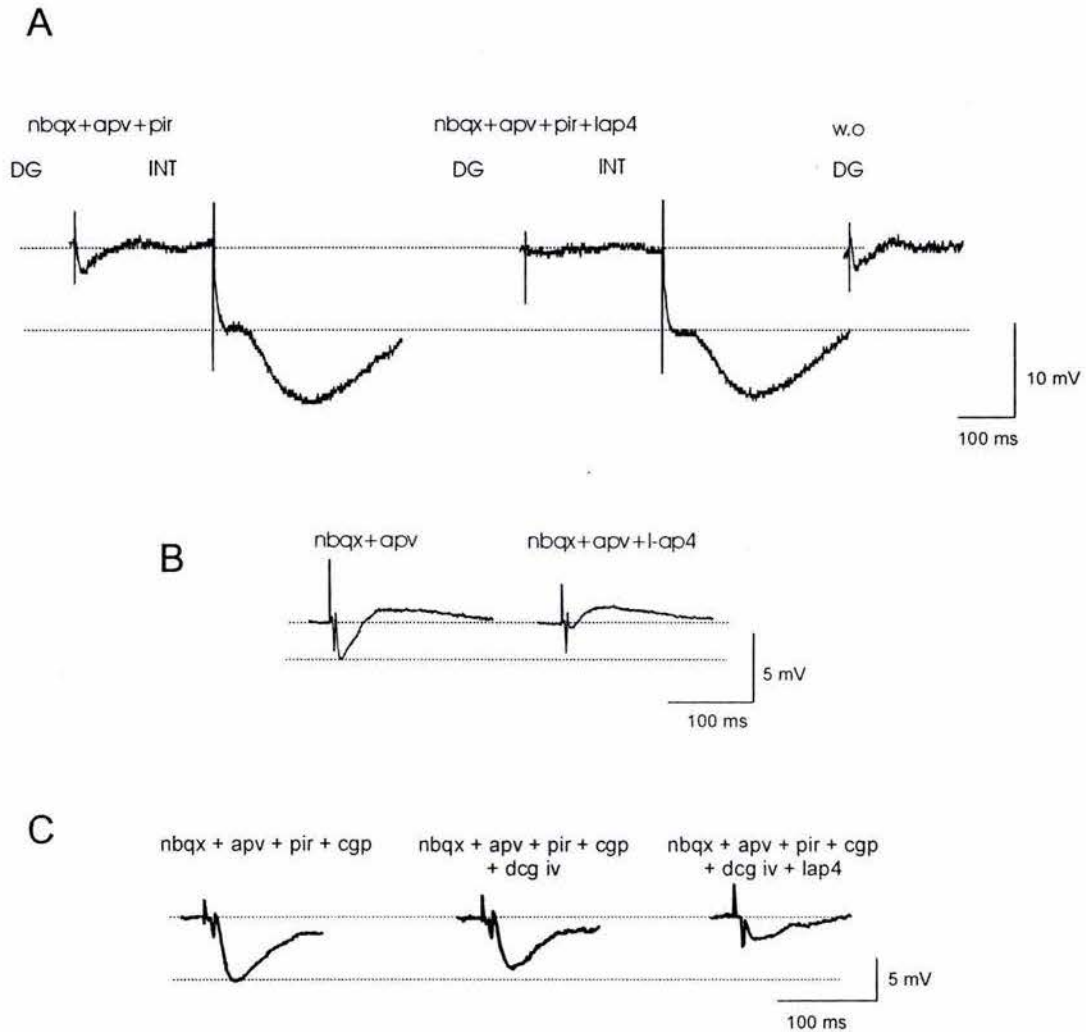


Fig. 5.5. Modulación presináptica y postsináptica del IPSP evocado por la activación de las fibras musgosas. A: Respuestas sinápticas producidas por la estimulación del GD e interneuronas locales (INT) bajo el bloqueo de la transmisión glutamatérgica y colinérgica. El IPSP aislado farmacológicamente, evocado por la estimulación del GD, es inhibido por L-AP4 mientras que los IPSP's rápidos y lentos evocados por la estimulación de interneuronas (INT) no se modifican. B: Respuestas sinápticas producidas por la estimulación del GD con bloqueo de la transmisión glutamatérgica. La perfusión de L-AP4 deprime el IPSP rápido pero no modifica el sEPSP. C: Respuestas sinápticas producidas por la estimulación del GD con bloqueo glutamatérgico y colinérgico. La perfusión de DCG-IV no altera el IPSP evocado por la estimulación del GD. Los trazos son promedios de 6-10 respuestas sinápticas.

Para determinar la modulación presináptica de los potenciales colinérgicos se evocaron sEPSPs en las células piramidales por la estimulación del GD y de A/C, como se muestra en la figura 5.4-A (ver métodos), en presencia de antagonistas glutamatérgicos y GABAérgicos tipo A y B (n= 93).

La perfusión de LAP-4 sobre el sEPSP no tuvo efecto alguno (figura 5.5-B). Por otro lado el DCG-IV bloqueó completamente el sEPSP evocado por la activación de la FM pero no tuvo efecto sobre el provocado por la estimulación de A/C (figura 5.6 A-B). La utilización de un protocolo de estimulación con pulsos pareados mostró que los efectos son consistentes con una acción presináptica del DCG-IV (Figura 5.6-C). Por lo tanto la activación de receptores metabotrópicos al glutamato del grupo II pero no del grupo III inhibe las respuestas colinérgicas evocadas por la estimulación del GD pero no las respuestas evocadas por la estimulación de A/C. Una posibilidad que plantea nuestra hipótesis es que el potencial colinérgico sea mediado por las fibras musgosas ya que, como fibras no colinérgicas, no expresan receptores muscarínicos del tipo M2. Por lo tanto, se probó el efecto del agonista M2, oxotremorina, en el sEPSP provocado por la estimulación de DG y A/C. La oxotremorina deprime completamente ambos sEPSP de forma reversible (n=10; figura 5.6 E-D). Este resultado sugiere que la transmisión colinérgica del GD a CA3 no es originada en las FM. Para comparar se probó el efecto de la oxotremorina en el EPSP glutamatérgico evocado por la estimulación del GD de preparaciones control. En estas condiciones no se observó efecto. (n= 5; figura 5.6-E).

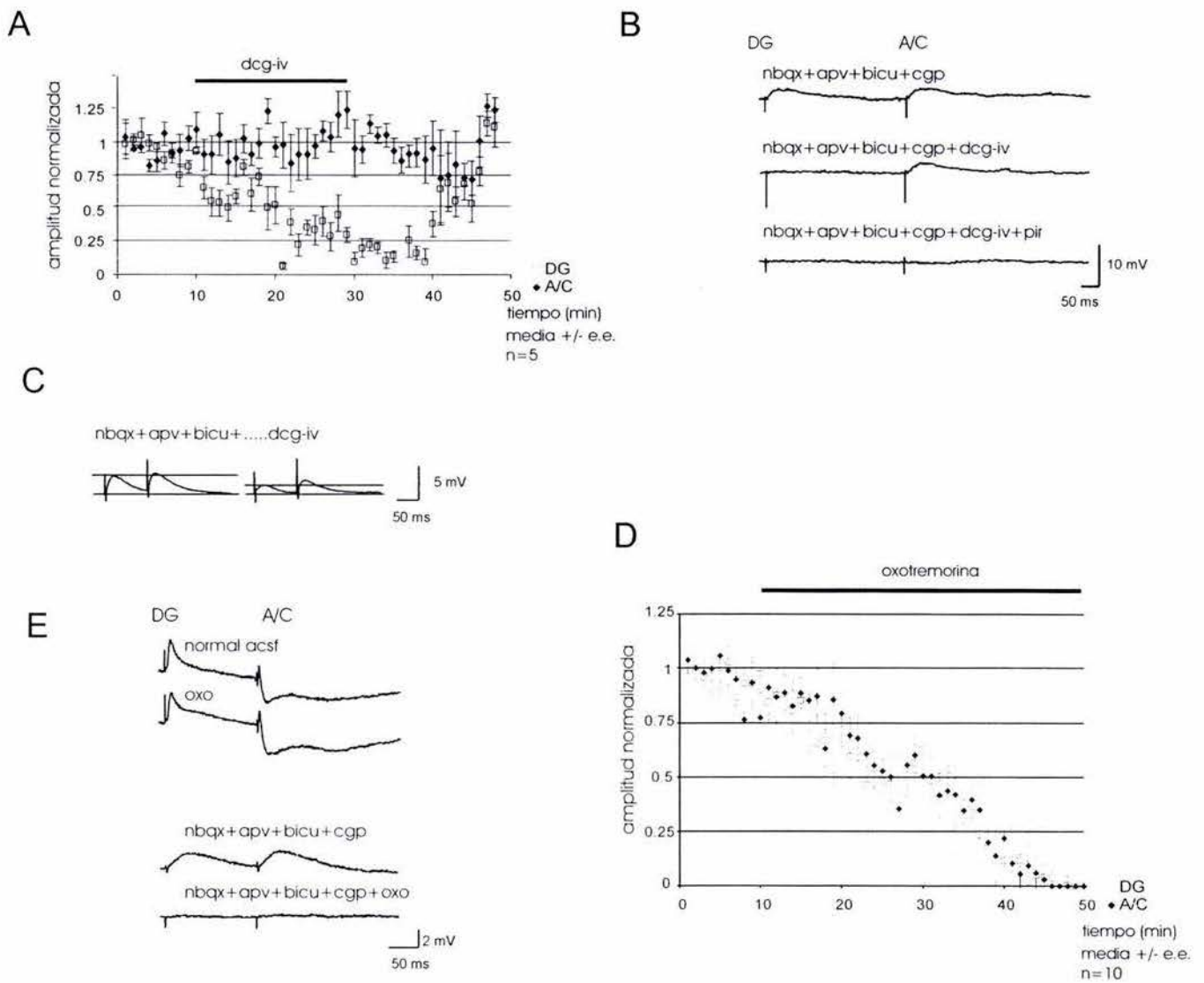


Fig. 5.6. Modulación presináptica de los potenciales colinérgicos evocados por la estimulación del giro dentado. A: Curso temporal que muestra la inhibición del sEPSP evocado en el GD pero no el evocado por la estimulación de A/C. Respuestas sinápticas a la estimulación del GD y A/C bajo el bloqueo de la transmisión glutamatergica y GABAérgica. Se muestra el bloqueo del sEPSP del GD con DCG-IV. C: El DCG-IV inhibe las respuestas sometidas a un protocolo de potenciación por pulsos pareados. Nótese que el primero pulso se mantiene con menor amplitud. D: Curso temporal de la inhibición producida por la oxotremorina sobre los sEPSP de DG y A/C. E: Respuestas sinápticas a la estimulación del GD y A/C en condiciones control y con bloqueo glutamatergico y GABAérgico. La oxotremorina no tiene efecto sobre las respuestas sinápticas en situación control (arriba) pero si en los sEPSP. Los trazos son promedios de 6-10 respuestas sinápticas.

Interacción de la transmisión colinérgica con la transmisión glutamatérgica en las células piramidales de CA3.

Para determinar si existe interacción entre la transmisión colinérgica con la transmisión glutamatérgica se perfundi6 el antagonista M1 pirenzepina en rebanadas de animales control y con una crisis sin bloqueo previo. La pirenzepina increment6 en un 24.2 +/- 2 % (n= 5; t student p<0.05) el EPSP control evocado por la estimulaci6n del GD en rebanadas procedentes de ratas con una crisis (figura 5.7 A1-A2).

Para determinar el efecto de la acetilcolina (ACh) sobre el EPSP glutamatérgico se perfundi6 ACh en rebanadas de animales control y con una crisis. La amplitud de los EPSPs glutamatérgicos de preparaciones control se increment6 16.72 +/- 12% y la amplitud de los EPSPs glutamatérgicos de preparaciones con una crisis se increment6 25.64 +/- 15% (figura 5.7-B). La perfusi6n de pirenzepina antes de la ACh previno el incremento de la amplitud en preparaciones control (figura 5.7-C). La aplicaci6n de acetilcolina sobre la transmisi6n colinérgica aislada (con antagonistas a receptores glutamatérgicos y GABAérgicos) despolariz6 la membrana (6 ± 87 mV), deprimi6 la hiperpolarizaci6n postpotencial e increment6 la frecuencia de disparo de las c6lulas piramidales.

La emergencia de la se~alizacion no glutamatérgica del GD a CA3 despu6s de crisis convulsivas es dependiente de la sntesis de prote6nas.

Est6 reportado que la inducci6n *in vitro* del IPSP procedente de las FM es dependiente de la sntesis de prote6nas (Gutierrez, 2002). Por tal motivo decidimos probar los efectos de dos bloqueadores de la sntesis de prote6nas (cicloheximida

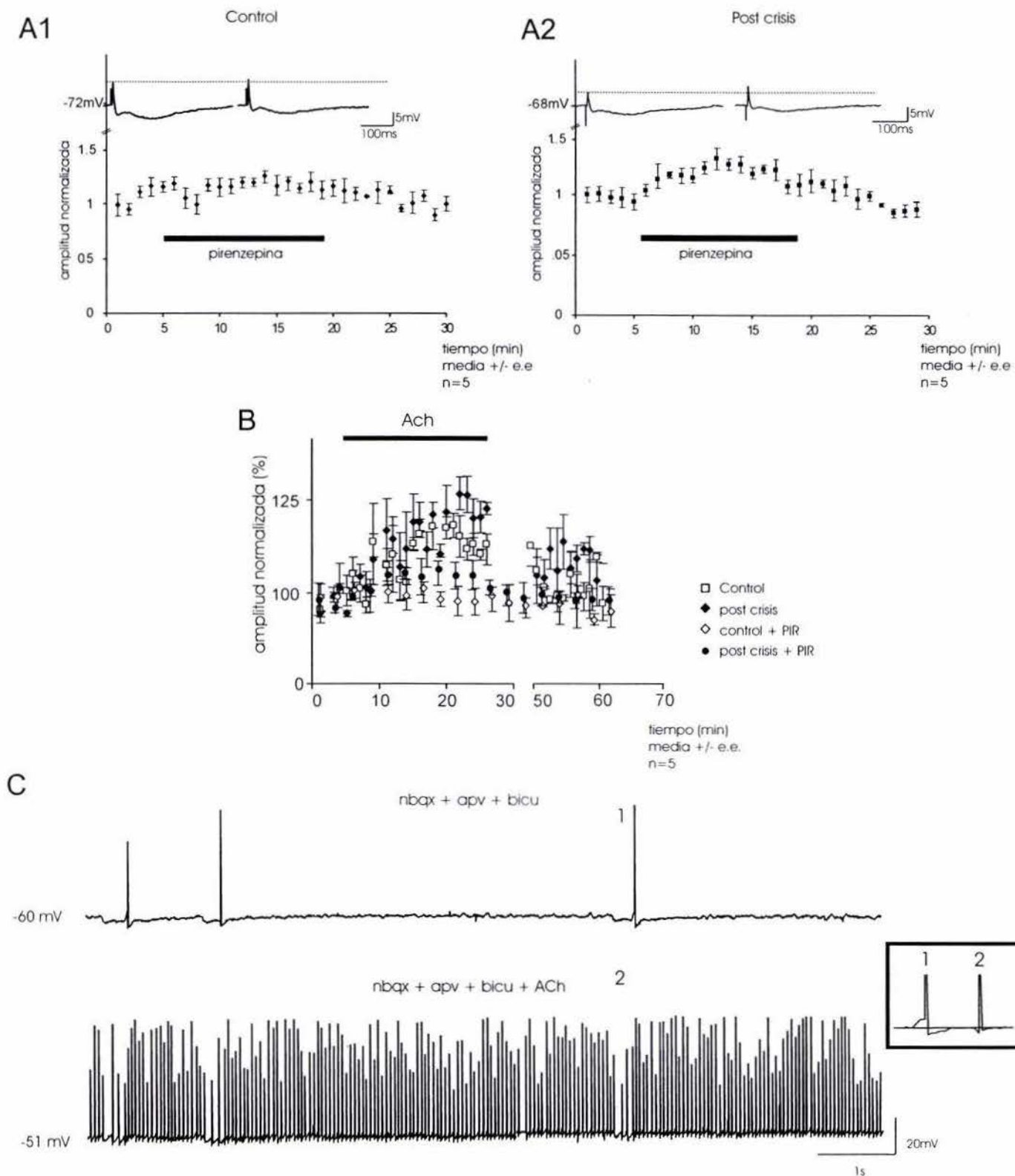


Fig. 5.7. La vía colinérgica activada por crisis convulsivas modula la transmisión sináptica en la proyección giro dentado-CA3 del hipocampo. A: Curso temporal que muestra el efecto de la pirenzepina en la transmisión intacta en preparaciones control (A1) y con crisis (A2). B: Curso temporal que muestra el efecto de la acetilcolina en la transmisión intacta en preparaciones control y con crisis. C: Registro espontáneo bajo el bloqueo de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica (arriba) y posterior a la aplicación de acetilcolina. (Recuadro) Potenciales de acción en cada condición, nótese la reducción de la hiperpolarización postpotencial. Los trazos son promedios de 6-10 respuestas sinápticas. Ach= Acetilcolina; PIR= pirenzepina

y anisomicina) en las señales no glutamatérgicas evocadas por la estimulación del GD en rebanadas obtenidas de animales tratados con PTZ. En rebanadas control (n=3 por cada inhibidor) y después de la incubación en los bloqueadores la estimulación del GD y de interneuronas provocó secuencias EPSP/IPSPs. La perfusión de antagonistas a los receptores al glutamato (ant-GluR) bloqueó las respuestas mono- y polisinápticas producidas por la estimulación del GD y aisló un IPSP monosináptico evocado por la estimulación de interneuronas (figura 5.8-C). En rebanadas procedentes de animales con una crisis (n=9 por cada inhibidor) los inhibidores de la síntesis de proteínas previnieron la aparición de la transmisión no GABAérgica procedente de las FM pero no afectó los IPSP de las interneuronas (figura 5.8 B y D).

Fibras inmunorreactivas a la colin-acetiltransferasa (ChAT) pasan a través del GD y a lo largo del stratum lucidum en CA3.

En colaboración con J. Maqueda (Romo-Parra y cols., 2003) se realizaron los experimentos de inmunofluorescencia para determinar si las FM contenían ChAT. Los experimentos se realizaron en rebanadas de animales control y con una crisis. Después de la tinción de las FM con dextranamina fluoresceinada aplicada en el GD (figura 5.9 A-B) se determinó su inmunoreactividad (IR) a la ChAT (figura 5.9-C y D) y se descartó la co-localización de la ChAT y la fluoresceína. Se observó IR a la ChAT en la región perisomática de las células piramidales y de las células granulares (figura 5.9-C1 y D1). En el stratum lucidum se observaron botones terminales y fibras finas marcadas con dextranamina (figura 5.9-C1). La IR a la ChAT, en CA3, se observó en fibras diferentes a las fibras musgosas (figura 5.9-

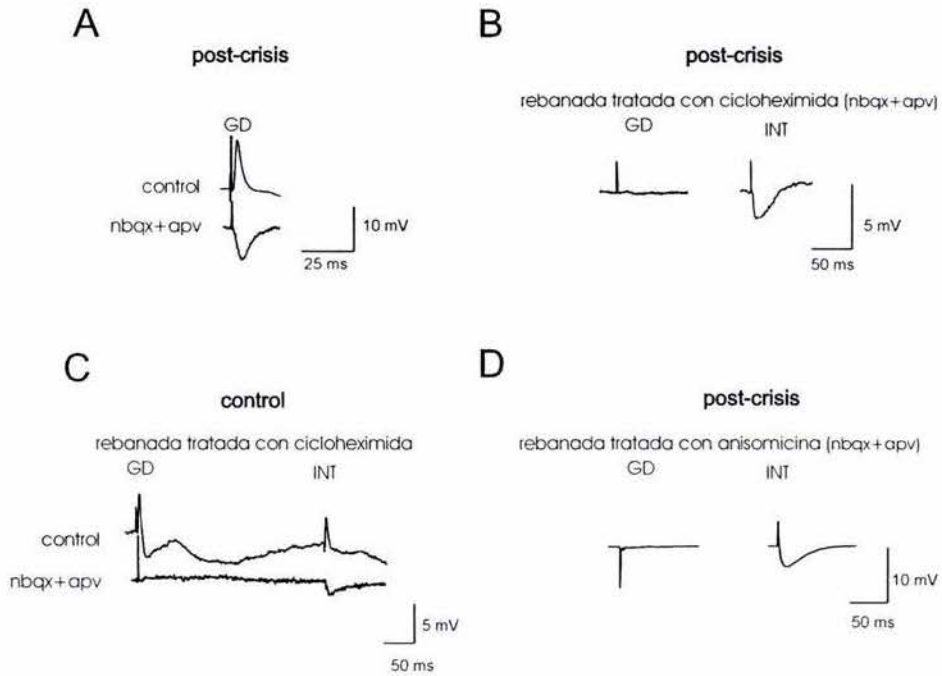


Fig. 5.8. La emergencia de las señales no glutamatergicas evocadas por la estimulación del giro dentado después de crisis es dependiente de la síntesis de proteínas. A: respuestas sinápticas de una célula piramidal de una preparación con crisis antes y después del bloqueo glutamatergico. B: La incubación de la rebanadas en cicloheximida previene la aparición del IPSP procedente de las FM pero no afecta el IPSP procedente de las interneuronas (INT). C: respuestas sinápticas de una célula piramidal de una preparación control tratada con cicloheximida antes y después del bloqueo glutamatergico. D: Al igual que con cicloheximida la anisomicina previene la aparición del IPSP procedente de las FM pero no el de interneuronas. Los trazos son promedios de 6-10 respuestas sinápticas.

C1 y C2). En la capa molecular del GD se encontraron interneuronas con IR a la ChAT (figura 5.9-D1) cuya orientación la distribución de sus terminales están restringidas al GD. También, en esta región, se observó IR a la ChAT en fibras que atraviesan las capas molecular (figura 5.9-D1) granular (figura 5.9-D1). No hubo diferencias en el marcado de la ChAT entre ratas control y ratas PTZ. Experimentos control (en ausencia de anticuerpo primario) no presentan IR a la ChAT (no se muestra).

La transmisión GABAérgica procedente de las FM se presenta como parte del desarrollo postnatal.

En ratas de 6 días de edad, las células piramidales responden a la estimulación del GD con un potencial despolarizante que es parcialmente bloqueado por antagonistas a los receptores ionotrópicos al glutamato (n=9; figura 5.10-A). La respuesta remanente es bloqueada completamente por bicuculina (n= 6; figura 5.10-A).

A partir del día 10 de edad la estimulación del GD provocó una secuencia de EPSP/IPSP's (figura 5.10-B). La perfusión de NBQX y APV bloquea el EPSP y aísla un IPSP en las rebanadas de ratas de 10, 15 y 20 días de nacidas (n=90; figura 5.10-D). Este IPSP es bloqueado por bicuculina. La latencia para cada IPSP aislado, por cada edad, no es diferente de la que corresponde al EPSP control (ANOVA de una vía y post ANOVA Scheffé) y la variabilidad de la latencia del IPSP (tanto como del EPSP) para cada neurona es consistente con un contacto monosináptico (6 d, $F = 1.1$; 10 d, $F = 1.0$; 15 d, $F=1.04$; 20 d, $F=1.4$; 22 d, $F=1.4$; $p<0.05$). Los valores de amplitud, latencia, tiempo al pico y tiempo de

subida de los EPSP monosinápticos control y de los MF-IPSP se encuentran concentrados en la tabla 5.2.

El agonista a los receptores metabotrópicos al glutamato (mGluR) del grupo III LAP-4, que inhibe selectivamente la transmisión GABAérgica de las FM, deprimió de forma reversible el potencial despolarizante (P6) y los IPSP (P10 a P22) provocados en células piramidales por la estimulación del GD en $83\pm 4\%$. Sin embargo las respuestas inhibitoras provocadas por la estimulación de interneuronas locales de la región CA3 no se modificaron con el LAP-4 ($n= 47$; figura 5.10-D).

La desaparición de las respuestas sinápticas GABAérgicas procedentes de las FM se presenta entre los días 22 y 23 de edad.

Para determinar el momento en el cual las respuestas sinápticas GABAérgicas evocadas por la estimulación del GD desaparecen se registraron células piramidales de ratas cada día a partir del día 22 de desarrollo. Se encontró que a P22 26 de 29 células presentaron respuestas inhibitoras en presencia de NBQX y APV. En el día P23, 4 de 30 células lo presentaron (figura 5.10-C) y, a partir del día 24, la estimulación del GD no provocó más respuestas GABAérgicas durante el bloqueo de los GluR ($n= 150$; figura 5.10-B). Esto demuestra que estos IPSP's monosinápticos desaparecen entre los días 22-23 (figura 5.10-C).

Esto concuerda con resultados de experimentos inmunocitoquímicos y de biología molecular llevados a cabo en paralelo en el laboratorio (Gutierrez y cols., 2003; Maqueda y cols., 2003)

La estimulación del giro dentado de ratas en desarrollo no produce respuestas colinérgicas, pero sí produce respuestas GABAérgicas.

En preparaciones de ratas de 10 y 20 días de edad la estimulación del giro dentado produjo respuestas GABAérgicas monosinápticas durante el bloqueo de la transmisión glutamatérgica. Como se mencionó anteriormente estas respuestas GABAérgicas se bloquean con bicuculina. Durante el bloqueo de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica la misma estimulación no produjo respuestas en las células piramidales (figura 5.10-B). En conclusión, las respuestas colinérgicas solo se pueden evocar en preparaciones de ratas a las cuales se les indujo crisis convulsivas.

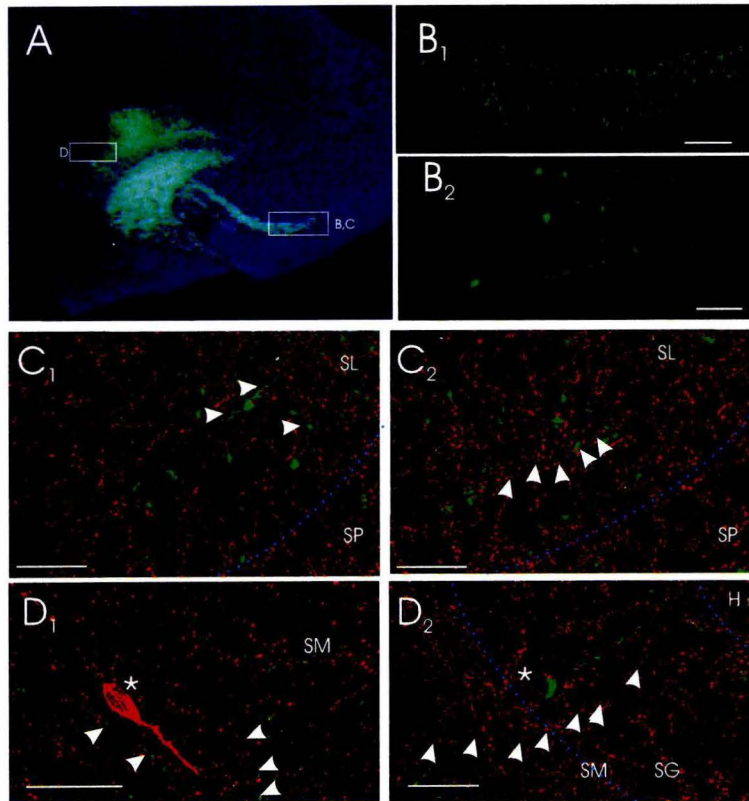


Fig. 5.9. Inmunofluorescencia a la ChAT que muestra reactividad en GD y CA3 pero no en FM. A: Vista panorámica de una rebanada de hipocampo que muestra a las FM marcadas con dextran fluoresceína, las regiones marcadas con letras corresponden a los siguientes paneles. FM en el stratum lucidum marcadas con dextran fluoresceína a dos ampliificaciones. C1: Preparación de una rata control donde se muestra las espinas de las fibras musgosas (flechas; verde) rodeado de IR para la ChAT en el stratum lucidum de CA3 (rojo) no se observa colocalización. C2: Algunas fibras colinérgicas que corren paralelamente a las FM pueden ser identificadas (flechas; rojo). D1: Algunas interneuronas locales en la capa molecular del GD muestran IR a la ChAT. Las flechas muestran algunas dendritas de las células granulares sin IR a la ChAT. D2: Las flechas muestran las fibras colinérgicas que pasan por la capa granular del GD. C1 y D1 corresponden a preparaciones procedentes de ratas control; C2 y D2 a preparaciones de animales con una crisis. Barras: B1=100 μ m; B2=20 μ m; C y D= 50 μ m. ABR: SL= stratum lucidum; SM: stratum moleculare; SG=stratum granular; SP= stratum piramidale, H= hilus.

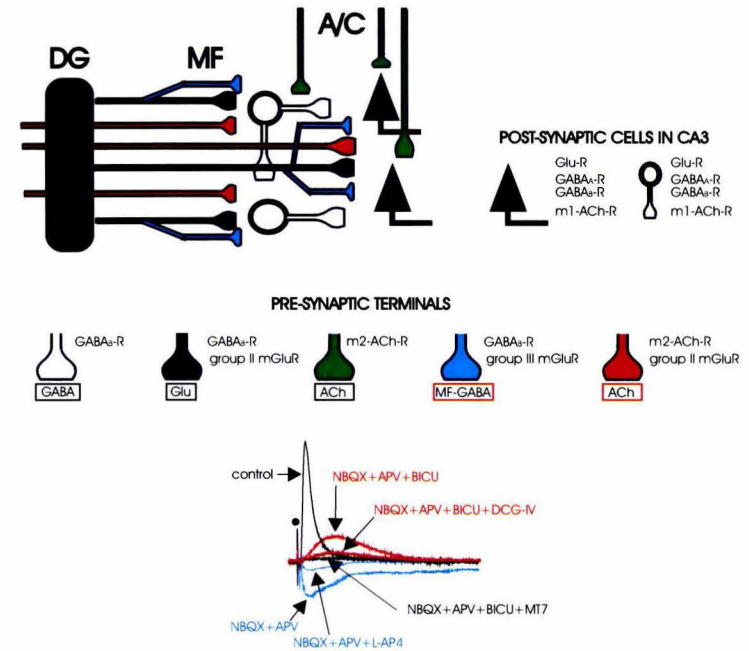


Fig. 6.1. Esquema que muestra la señalización dependiente de actividad a los diferentes blancos de CA3. El diagrama muestra las diferentes fibras que son activadas por la estimulación del GD, donde cada color representa una clase diferente de neurotransmisor y su respectiva terminal. Cada terminal posee diferentes receptores presinápticos que le confieren cierta modulación selectiva. ABAJO: registro de una célula piramidal que muestra los diferentes componentes evocados por la estimulación del GD y su modulación ante diferentes esquemas farmacológicos. La estimulación del GD evoca un EPSP glutamatergico (negro). Al bloquear la transmisión glutamatergica se aísla un IPSP procedente de las FM (azul). Junto con esta respuesta, la misma estimulación activa fibras colinérgicas que evocan un mEPSP (rojo) el cual modula la transmisión rápida en el circuito. La liberación de GABA de las FM es modulada por mGluR-III mientras que la liberación de glutamato de las mismas fibras es modulada por mGluR-II lo que sugiere que se encuentran compartimentalizadas. La transmisión colinérgica evocada por la estimulación del GD, pero no la de A/C, es inhibida presinápticamente por la activación de mGluR-II y ambas señales colinérgicas son moduladas por receptores M2. Al estimular el GD se estimulan fibras colinérgicas que se encienden de forma dependiente de actividad y tienen mecanismos de modulación similares a las FM. Tanto las células piramidales como las interneuronas de CA3 integran las señales glutamatergicas, GABAérgicas y colinérgicas de forma emergente ante el incremento de actividad del sistema. Además las últimas dos señales son dependientes de la síntesis de proteínas. Los trazos son promedios de 6-10 respuestas.

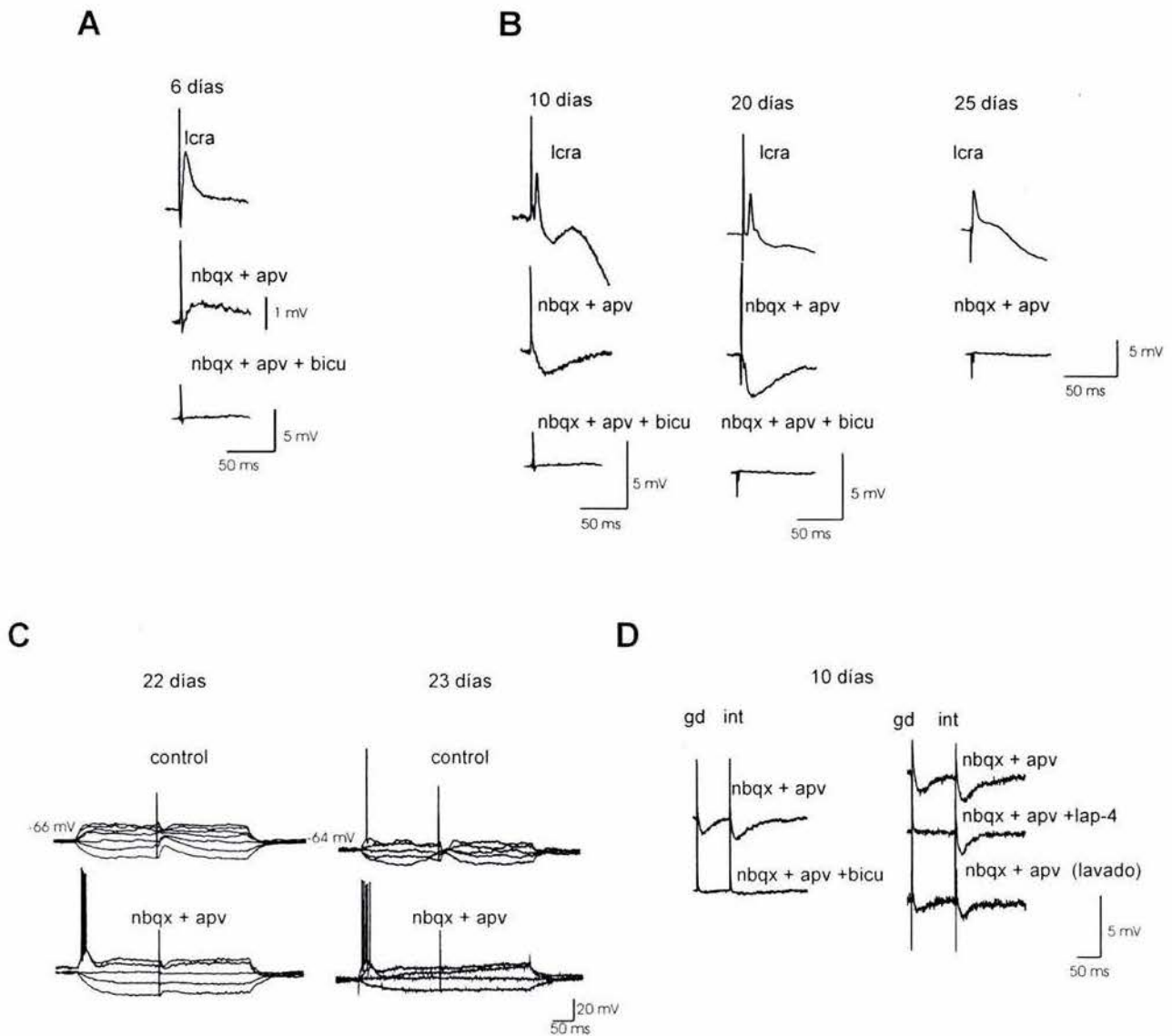


Fig. 5.10. La transmisión GABAérgica procedente de las fibras musgosas se presenta normalmente durante el desarrollo. A: En preparaciones de 6 días y bajo el bloqueo de la transmisión glutamatérgica, la estimulación del GD evoca potenciales despolarizantes que se bloquean con Bicuculina. **B:** A partir de la segunda semana de vida la misma estimulación, bajo el bloqueo glutamatérgico, evoca potenciales hiperpolarizantes GABAérgicos que no están presentes a los 25 días. **C:** respuestas sinápticas evocadas por la estimulación del GD a diferentes potenciales de membrana a los 22 y 23 días. Se muestra que a los 23 días no hay IPSP. **E:** El IPSP monosináptico es sensible a bicuculina y a L-AP4. Los trazos son promedios de 6-10 respuestas.

CAPITULO 7

DISCUSION

Los resultados de esta tesis muestran que después de la presencia de crisis convulsivas únicas, la estimulación del giro dentado produce, además de respuestas glutamatérgicas monosinápticas, respuestas GABAérgicas monosinápticas en las células piramidales de CA3. Además, al bloquear estas respuestas, se observa un potencial excitador lento monosináptico, mediado por receptores muscarínicos tipo M1 y que modula la transmisión glutamatérgica y GABAérgica. Este potencial excitador lento no se presenta durante el desarrollo pero, en el adulto, puede ser inducido por crisis convulsivas. La emergencia de las señales GABAérgica y colinérgica provocadas por la estimulación del GD requiere de la síntesis de proteínas y su modulación presináptica es diferente para cada una. Estos datos y aquéllos obtenidos por inmunohistoquímica y microscopía confocal demuestran que la señal colinérgica tiene un origen diferente a las fibras musgosas, lo que nos permite proponer la existencia de una vía colinérgica hacia CA3, que es normalmente silente.

También mostramos que las células granulares de ratas en desarrollo normalmente son capaces de liberar, además de glutamato, GABA. Esta transmisión GABAérgica desaparece entre los días 22-23 postnatales.

Las crisis convulsivas únicas provocan que las células granulares liberen GABA, además de glutamato.

En condiciones control la estimulación del GD produce en las células piramidales de CA3 una secuencia EPSP/IPSPs (Lawrence y McBain, 2003). La perfusión de antagonistas a receptores ionotrópicos al glutamato bloquean todas estas respuestas sinápticas lo que demuestra la naturaleza disináptica de los potenciales GABAérgicos (Dichter y Spencer, 1969a; Dichter y Spencer, 1969b; Yamamoto, 1972; Crawford y Connor, 1972). Sin embargo en preparaciones procedentes de ratas tratadas con PTZ se comprobó que al bloquear la transmisión glutamatérgica, la estimulación del GD provoca respuestas GABAérgicas monosinápticas (FM-IPSP) (Gutierrez, 2000). El bloqueo de la transmisión glutamatérgica descarta la posibilidad de reclutar interneuronas que produzcan respuestas inhibitoras polisinápticas (Sik y cols., 1994; Weisskopf y Nicoll, 1995). Además, el que las respuestas GABAérgicas obtenidas en nuestros experimentos sean de origen interneuronal parece improbable por las siguientes razones: 1) La estimulación del hilus (Gutierrez y Heinemann, 2001) y de la capa granular (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001; Gutierrez, 2002) de animales control no producen respuestas GABAérgicas monosinápticas en las células piramidales de CA3 ni en interneuronas locales (Romo-Parra y cols., 2003). Sin embargo después de un estado epiléptico, de crisis convulsivas únicas o de la estimulación del GD con un protocolo tipo LTP, estas respuestas inhibitoras son observadas en presencia de bloqueadores a los receptores a glutamato. 2) Existe evidencia de la presencia de algunas interneuronas

GABAérgicas a la región CA3c que alcanzan el hilus (Sik y cols., 1994), sin embargo éstas se encuentran en el stratum oriens en la región CA3 y pocas dendritas proyectan al hilus. 3) Las interneuronas locales que hacen contactos con células de CA3 no proyectan fuera de esta región. 4) La estimulación que evoca las respuestas GABAérgicas monosinápticas se realiza sobre la capa molecular del GD y no sobre el hilus. 5) No hay evidencia anatómica de la existencia de proyecciones de interneuronas GABAérgicas desde la capa molecular del GD hasta la zona CA3. 6) En preparaciones procedentes de animales control la estimulación directa del GD a alta frecuencia, en presencia de bloqueadores de receptores a glutamato, provoca la aparición de respuestas GABAérgicas monosinápticas (Gutiérrez, 2002). 7). Sólo los IPSPs evocados por la estimulación del GD, y no los provocados por la estimulación directa de interneuronas, son sensibles a la activación de receptores metabotrópicos al glutamato del grupo III y al bloqueo de la síntesis de proteínas (Gutierrez, 2002; Romo-Parra y cols., 2003). Estas evidencias apoyan fuertemente la hipótesis de que existe un mecanismo que activa la expresión del fenotipo GABAérgico de las células granulares de manera dependiente de actividad.

Los potenciales excitador e inhibitor producidos por la estimulación del GD tienen latencias similares (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001; Walker y cols., 2001; Gutierrez, 2002). La latencia del MF-IPSP no se afecta por: 1) La aplicación de agonistas a receptores metabotrópicos al glutamato o GABA_B (Baclofén) que se sabe que disminuyen la liberación de neurotransmisor procedente de las FM (Brown y Johnston, 1983; Gutierrez, 2002) y 2) por la aplicación de un medio bajo en Ca⁺⁺ que se sabe que disminuye la probabilidad de liberación del

neurotransmisor (Gutierrez, 2000). Estos datos proporcionan fuerte evidencia de que el IPSP es monosináptico.

El bloqueo de la síntesis de proteínas tiene efecto sobre la transmisión de las FM (Huang y cols., 1994; Barea-Rodriguez y cols., 2000). La anisomicina disminuye la excitabilidad de las células granulares (Fifkova y cols., 1982) y previene el incremento, como consecuencia de la potenciación a largo plazo, de la sinaptofisina (Mullany y Lynch, 1997) y la cicloheximida impide la ramificación aberrante de las FM debido de un estado epiléptico (Covolan y cols., 2000; Longo y cols., 2003). En el presente trabajo se comprobó que la síntesis de proteínas es necesaria para iniciar el proceso de liberación de GABA de las FM y que su bloqueo no afecta la transmisión glutamatérgica control (Gutierrez, 2002; Romo-Parra y cols., 2003; este trabajo). Aunque se ha establecido que el bloqueo de la síntesis de proteína previene la transmisión GABAérgica de las FM no se conoce el paso restrictivo. Posiblemente se altere la síntesis de GAD, GABA o la proteína esencial para la vesiculación del GABA (Gutierrez, 2003). También algún mecanismo de la liberación puede alterarse. Estudios recientes reportan una relación estructural y funcional entre la síntesis y la vesiculación del GABA (Jin y cols., 2003). Estos autores muestran que la actividad del VGAT se deprime por inhibidores de la GAD. Por lo tanto la alteración de uno u otro afecta la liberación de GABA. Los resultados de esta tesis muestran que la emergencia de la transmisión GABAérgica de las FM no depende de la activación de la célula postsináptica y, junto con la sobre expresión de la GAD y el VGAT, revela la naturaleza presináptica del fenómeno.

En este trabajo de tesis se demostró que la señal GABAérgica de FM es fuertemente deprimida por la activación de mGluR-III pero no tiene efecto sobre la liberación de GABA procedente de interneuronas locales de CA3, como fue reportado por Walker y cols. (2001). Esto sugiere que la respuesta GABAérgica efectivamente proviene de las FM ya que la inhibición de la liberación al activar mGluR se usa como herramienta para identificar la neurotransmisión de las FM (Manzoni y cols., 1995; Salin y cols., 1996; Tong y cols., 1996; Vogt y Nicoll, 1999). Además, el hecho de que los receptores mGluR-III tengan una mayor efectividad que los mGluR-II nos ha permitido sugerir que estos pueden interactuar con la maquinaria de liberación del GABA, mientras que los mGluR-II la tienen con la maquinaria de liberación de glutamato. La interacción de un receptor presináptico con la maquinaria de liberación ha sido previamente sugerida por Kamiya y Ozawa (1999). Experimentos de microscopía electrónica han revelado inmunomarcaje para mGluR-III en la presinapsis de las zonas activas tanto de sinapsis simétricas como de asimétricas, e inmunomarcaje para mGluR-II en las porciones terminales de los axones (Shigemoto y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997). Esto sugiere que existe una segregación en la presinapsis de los mGluR de acuerdo al grupo de receptores y la clase de neurotransmisores liberados. Por lo anterior se puede concluir que no solo la inhibición de la entrada de Ca^{++} (Vogt y Regehr, 2001) explica la inhibición de neurotransmisor de las FM sino que también esta inhibición es debida a la interacción de la señalización intracelular de los diferentes receptores.

Como fue mencionado en la introducción, nuestros resultados electrofisiológicos son apoyados por evidencias inmunohistoquímicas, neuroquímicas y de biología molecular que muestran que los marcadores del fenotipo GABAérgico son expresados en las células granulares de manera dependiente de actividad (Schwarzer y Sperk, 1995; Sloviter y cols., 1996; Rao y cols., 2000; Lamas y cols., 2001; Ramirez y Gutierrez, 2001; Gomez-Lira y cols., 2002; para revisión ver:Gutierrez, 2005).

Las crisis convulsivas inducen la aparición de un potencial excitador colinérgico en las células piramidales de CA3 por la activación del GD.

Debido a que la estimulación del GD produce también respuestas colinérgicas monosinápticas, se podría suponer que las FM también son responsables de la liberación de acetilcolina. Esta posibilidad fue sugerida por experimentos que mostraban la posible pluripotencialidad de las células granulares. En estos experimentos, se mostró que células madre del GD, y que dan origen a las células granulares en el adulto, se pueden diferenciar en glutamatérgicas, GABAérgicas y colinérgicas (Toda y cols., 2000; Vicario-Abejon y cols., 2000) . Nuestros datos, señalan que las células granulares y sus FM no son las responsables de esta respuesta colinérgica. Además estas respuestas colinérgicas no se observan durante el desarrollo.

En este trabajo se sugiere que una vía colinérgica, que normalmente está silente, pero que se activa después de crisis convulsivas, modula a las células piramidales, independientemente de la modulación ejercida por la vía A/C sobre las FM (Williams y Johnston, 1990; Martin y Alger, 1999; Vogt y Regehr, 2001).

La emergencia de esta respuesta colinérgica, al igual que el FM-IPSP, también es un proceso dependiente de la síntesis de proteínas ya que es bloqueada por la incubación de las rebanadas en bloqueadores de la síntesis de proteínas.

Normalmente solo se pueden producir respuestas colinérgicas en células piramidales del hipocampo por la estimulación a alta frecuencia o alta intensidad de las aferente colinérgicas (Cole y Nicoll, 1984a; Cole y Nicoll, 1984b; Müller y Misgeld, 1986; Brunner y Misgeld, 1994; Morton y Davies, 1997; Morton y cols., 2001).

Se ha descrito que la entrada colinérgica al hipocampo, procedente del séptum modula la proyección FM-CA3 mediante la activación de interneuronas que, a su vez, inhiben a las células piramidales y a las FM (Williams y Johnston, 1990; Martin y Alger, 1999; Vogt y Regehr, 2001). La muscarina eleva el disparo de las interneuronas y estas liberan más GABA. El GABA liberado actúa en los receptores GABA_B de las FM e inhibe la liberación de estas fibras (Vogt y Nicoll, 1999; Vogt y Regehr, 2001).

Así, en presencia de bloqueadores de receptores a glutamato la estimulación del GD de rebanadas de animales control, no provoca respuesta sináptica alguna. Sin embargo, después de crisis convulsivas la estimulación del GD en presencia de bloqueadores a receptores de glutamato y GABA produce respuestas colinérgicas en células piramidales y en interneuronas locales de CA3 (Gutierrez y Heinemann, 2001; Romo-Parra y cols., 2003). Existen respuestas bifásicas de GABA que pudieran explicar este potencial despolarizante (Staley y cols., 1995). Sin embargo el potencial postsináptico excitador lento (sEPSP) no es sensible a bicuculina. Estas respuestas son producto de la activación de receptores M1 puesto que se

bloquean por antagonistas a estos receptores. Es decir, la transmisión colinérgica a CA3 se activa de forma dependiente de actividad puesto que no se presenta en preparaciones control (Gutierrez y Heinemann, 2001).

Además de identificar el origen de estas respuestas, describimos que el sEPSP del GD y no el producido por la estimulación de vías colinérgicas (A/C) se bloquea por el agonista de los receptores metabotrópicos al glutamato del tipo II (DCG-IV) y el efecto es reversible, por lo que esta vía contiene mGluR-II. Los receptores colinérgicos del tipo M2 se encuentran localizados en A/C y su activación modula la liberación de acetilcolina de estas fibras colinérgicas (Rouse y cols., 1997; Rouse y Levey, 1997; Rouse y cols., 1999; Rouse y cols., 2000; Vogt y Regehr, 2001). Las FM no tienen receptores del tipo M2 (Hajos y cols., 1998b) por lo que agonistas colinérgicos, que activan receptores M2, inhiben directamente a la vía A/C sin afectar las sinapsis de las FM (Vogt y Regehr, 2001). La perfusión de oxotremorina (agonista M2) bloquea tanto las respuestas evocadas por la estimulación de A/C como las respuestas evocadas por la estimulación del GD (Romo-Parra y cols., 2003) por lo tanto ambas vías poseen receptores M2. Esto indica que el sEPSP no tiene su origen en las FM.

La regulación colinérgica de la transmisión glutamatérgica (Aigner, 1995) influye en la plasticidad sináptica del hipocampo y en procesos como la memoria y el aprendizaje (Madison y cols., 1991; Goda y Stevens, 1996; Hasselmo, 1999) y las lesiones de la proyección septo-hipocampal producen déficits en la atención y la memoria (Hasselmo, 1999). Está reportado que la activación de receptores muscarínicos modula a los receptores NMDA (Markram y Segal, 1990). Crisis

convulsivas generalizadas incrementan la expresión de receptores M1 y M2 y con ello un aumento a largo plazo de la eficacia de los receptores muscarínicos en el hipocampo (Potier y cols., 2005). Se observó que el bloqueo de receptores M1 en preparaciones con crisis, pero no en preparaciones control, incrementa la amplitud de los potenciales glutamatérgicos.

Por último la activación de receptores M1 con acetilcolina incrementa la resistencia de la membrana y la frecuencia de disparo al deprimir la hiperpolarización postpotencial como ha sido ampliamente reportado (Benardo y Prince, 1982; Cole y Nicoll, 1984a; Cole y Nicoll, 1984b; Williams y Johnston, 1990) y demuestra que el sEPSP no es provocado por la activación de receptores no colinérgicos como se ha sugerido (Staley y cols., 1995)

En conclusión la señal colinérgica provocada por la estimulación del GD modula postsinápticamente la convergencia de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en las células piramidales y junto con la distintiva modulación de las vías que se activan con la estimulación del GD se puede establecer otra forma de modulación de la liberación de neurotransmisores (Min y cols., 1998a; Hajos y cols., 1998a; Rusakov y cols., 1999; Semyanov y Kullmann, 2000; Vogt y Regehr, 2001).

En apoyo a los resultados anteriores los experimentos llevados a cabo con técnicas inmunohistoquímicos descartan la presencia de ChAT en las FM y muestran una vía que pasa por el giro dentado y corre paralelamente a estas fibras. Esta vía colinérgica se enciende de manera dependiente de actividad, de acuerdo a resultados previos (Frotscher y Leranth, 1985; Makuch y cols., 2001)

hay fibras colinérgicas inmunopositivas que forman una red alrededor de las células granulares en el GD y alrededor de células piramidales e interneuronas de CA3. Las terminales observadas en la región CA3 son colaterales que también inervan al GD. Está reportado que hay interneuronas colinérgicas cuya arborización se localiza en la capa molecular del GD (Blaker y cols., 1988; Frotscher y cols., 2000). Adicionalmente Frotscher y cols (2000) muestra que ni la GAD₆₅ ni la GAD₆₇ co-localizan con interneuronas locales colinérgicas (Fig. 5.10)

La liberación de GABA de fibras musgosas, que son glutamatérgicas, se presenta normalmente durante el desarrollo postnatal.

Walker y cols (2001) demostraron, con registros en célula completa (whole cell), que la transmisión inhibitoria de las FM se presenta en rebanadas procedentes de cobayos de 10 días de nacidos en ausencia de incrementos de excitabilidad. Estos autores reportaron que la activación de las FM evoca en las células piramidales de CA3 respuestas glutamatérgicas, GABAérgicas y combinadas de corta latencia y poseen características fisiológicas y farmacológicas distintivas de las FM. Como se menciona en la hipótesis, estos resultados parecieran ser inconsistentes con los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001; Gutierrez, 2002; Romo-Parra y cols., 2003) ya que nosotros solamente la hemos observado después del incremento de excitabilidad. Sin embargo, existe la posibilidad de que la liberación de GABA de las FM pudiera ser debido a la edad de los sujetos estudiados.

En este trabajo se muestra que, efectivamente, la transmisión GABAérgica de las FM está presente normalmente durante el desarrollo. A los 6 días postnatales (P6) la activación de las FM, en presencia de bloqueadores a los receptores a glutamato, evoca en células piramidales un potencial despolarizante que es bloqueado por bicuculina y cuyo potencial de inversión coincide con el potencial de inversión de las respuestas GABAérgicas descritas para esta edad (Ganguly y cols., 2001). Después de la primera semana de vida, la misma estimulación, en las mismas condiciones farmacológicas, provoca respuestas GABAérgicas hiperpolarizantes que desaparecen entre los días P23 y P24. Ambas respuestas despolarizantes e hiperpolarizantes GABAérgicas, evocadas por la estimulación del GD, son inhibidas por el agonista a los receptores metabotrópicos al glutamato LAP-4 que inhibe la transmisión GABAérgica de las FM (Gutierrez, 2000; Walker y cols., 2001; Gutierrez, 2002; Romo-Parra y cols., 2003; este trabajo).

Es necesario realizar investigaciones adicionales para establecer si el glutamato y el GABA son liberados de la misma terminal y determinar como la proporción de liberación de ambos aminoácidos varía durante el desarrollo.

En ratas en desarrollo la estimulación del hilus provoca descargas sincrónicas gigantes mediadas principalmente por receptores GABA_A y por una entrada sináptica procedente de las FM (Ben Ari y cols., 1989). Sin embargo por resultados previos (Gutierrez, 2000; Gutierrez y Heinemann, 2001; Gutierrez, 2002; para revisión: Gutierrez y cols., 2003) se puede sugerir que estas respuestas GABAérgicas tienen su origen en las FM. Las lesiones del GD

bloquean la mayor parte de la excitación hacia estas células (Henze y cols., 1997) lo que sugiere que la transmisión GABAérgica de las FM puede ser alterada.

Durante la primera semana del desarrollo el GABA posee un efecto despolarizante debido a que el gradiente para Cl^- se encuentra invertido, es decir, hay mayor concentración del ión cloro dentro de la célula (Ben Ari y cols., 1997). La interpretación fisiológica para este fenómeno es que en este periodo los receptores AMPA no se han expresado, por lo tanto el GABA provee la despolarización necesaria para remover el Mg^{++} de los receptores NMDA y pueden ser activados. Por esto la activación de receptores a GABA y glutamato ocurre en forma sinérgica durante el desarrollo de las ratas al proporcionar la fuerza excitadora de activación (Leinekugel y cols., 1997). Se puede sugerir que la transmisión GABAérgica de las FM contribuye para el desarrollo de las neuronas de CA3 y desaparece al finalizar el desarrollo. Es importante destacar que la desaparición de las respuestas GABAérgicas ocurre dos semanas después de que el GABA ha dejado de ejercer su efecto despolarizante cuando la sinaptogénesis está establecida (Ben Ari y cols., 1989; Ben Ari y cols., 1997) y el desarrollo se ha completado. Esto sugiere que la transmisión inhibitoria va de la mano con la maduración morfológica de las células piramidales posiblemente hasta el completo desarrollo de las dendritas y las espinas (Ben Ari, 2001).

Los hallazgos electrofisiológicos descritos durante el desarrollo coinciden con la expresión de inmunoreactividad al GABA, GAD y el mRNA para el VGAT en las células granulares y sus fibras musgosas (Gutierrez y cols., 2003; Maqueda y cols., 2003).

Implicaciones funcionales.

Se han propuesto dos funciones principales relacionadas con la cotransmisión glutamatérgica y GABAérgica procedente de las fibras musgosas (Gutierrez, 2003).

La primera está en relación directa con el desarrollo del hipocampo en el cual se necesita de un efecto sinérgico entre glutamato y GABA para despolarizar a las neuronas postsinápticas para que éstas puedan ser excitadas (Leinekugel y cols., 1997) ya que la excitación del sistema es necesaria para su maduración (Ben Ari y cols., 1997). Durante la primera semana postnatal la relación entre las FM y las despolarizaciones GABAérgicas gigantes de células piramidales incrementa la eficacia sináptica en la proyección FM-CA3 (Kasyanov y cols., 2004). Esta actividad puede contribuir al refinamiento de la conectividad neural antes del establecimiento de los circuitos neurales (Gutierrez, 2005). Coincidentemente con el final de desarrollo se presenta la desaparición de la transmisión GABAérgica y sus marcadores. Un ejemplo donde la expresión glutamatérgica y GABAérgica tiene implicaciones funcionales se encuentra en la proyección del núcleo medial del cuerpo trapezoide. Está proyección expresa un fenotipo GABAérgico y glicinérgico sin embargo durante el desarrollo puede liberar glutamato (Gillespie y cols., 2005).

La desaparición de la transmisión GABAérgica y sus marcadores concuerda con la maduración de las ratas.

Puede sugerirse que la segunda posible función de la transmisión GABAérgica de esta proyección sea un mecanismo de protección que compense la

hiperexcitabilidad producida por las crisis convulsivas y, posiblemente, ayude a evitar su recurrencia (Gutierrez, 2000). La transmisión GABAérgica de las FM tiene efectos netos inhibidores sobre las células piramidales debido a que su activación a altas frecuencias provoca sumación de los IPSP's en células piramidales, lo que hiperpolariza las células (Gutierrez y Heinemann, 2001). El mismo tipo de estimulación produce sumación de potenciales postsinápticos excitadores en las interneuronas (Gutierrez y Heinemann, 2001; Vivar y Gutierrez, 2005).

El "encendido" de las fibras colinérgicas que pasan por el GD y que tienen como blanco postsináptico la región CA3, demuestra la gran plasticidad de la proyección.

La alta selectividad en las respuestas, GABAérgicas y colinérgicas, a la activación de mGluR permite aislarlos para su estudio (Romo-Parra y cols., 2003). Este aislamiento se presenta en el modelo de la figura 6.1. La activación selectiva de mGluR-II inhibe la transmisión excitadora (glutamatérgica de las FM y colinérgica aislada) pero no la transmisión inhibitoria de las FM (Lanthorn y cols., 1984; Ohishi y cols., 1995; Bradley y cols., 1996; Shigemoto y cols., 1997; Romo-Parra y cols., 2003; este trabajo); esta transmisión GABAérgica actúa presinápticamente en receptores GABA_B y postsinápticamente en células piramidales e interneuronas. Por otro lado, la activación de mGluR-III inhibe selectivamente los FM-IPSP (Walker y cols., 2001; Romo-Parra y cols., 2003) sin afectar la transmisión glutamatérgica y colinérgica. La liberación de glutamato activa presinápticamente los mGluR.

Referencias

1. Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18: 3386-3403.
2. Acsady L, Katona I, Martinez-Guijarro FJ, Buzsaki G, Freund TF (2000) Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 6907-6919.
3. Aigner TG (1995) Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr Opin Neurobiol* 5: 155-160.
4. Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182: 851-914.
5. Amaral DG (1979) Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anat Embryol (Berl)* 155: 241-251.
6. Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195: 51-86.
7. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B (1990) Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* 83: 1-11.
8. Amaral DG, Kurz J (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 240: 37-59.
9. Amaral DG, Witter MP (1989a) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.
10. Amaral DG, Witter MP (1989b) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.
11. Amaral DG, Woodward DJ (1977) A hippocampal interneuron observed in the inferior region. *Brain Res* 124: 225-236.
12. Andersen P, Eccles JC, Loyning P (1963) Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature* 198: 540-542.

13. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42: 351-363.
14. Bannister NJ, Larkman AU (1995) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions. *J Comp Neurol* 360: 161-171.
15. Barea-Rodriguez EJ, Rivera DT, Jaffe DB, Martinez JL, Jr. (2000) Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation in vivo. *J Neurosci* 20: 8528-8532.
16. Battaglioli G, Liu H, Martin DL (2003) Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *J Neurochem* 86: 879-887.
17. Baudry M, Lynch G (1981) Hippocampal glutamate receptors. *Mol Cell Biochem* 38 Spec No: 5-18.
18. Behrends JC, ten Bruggencate G (1993) Cholinergic modulation of synaptic inhibition in the guinea pig hippocampus in vitro: excitation of GABAergic interneurons and inhibition of GABA-release. *J Neurophysiol* 69: 626-629.
19. Ben Ari Y (2001) Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 42 Suppl 3: 5-7.
20. Ben Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416: 303-325.
21. Ben Ari Y, Holmes GL (2005) The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Curr Opin Neurol* 18: 141-145.
22. Ben Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20: 523-529.
23. Ben Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL (1994) gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog Brain Res* 102: 261-273.
24. Benardo LS, Prince DA (1982) Cholinergic excitation of mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* 249: 315-331.
25. Bergersen L, Ruiz A, Bjaalie JG, Kullmann DM, Gundersen V (2003) GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses. *Eur J Neurosci* 18: 931-941.

26. Bernard C, Hirsch J, Ben Ari Y (1997) [Glutamatergic excitatory receptors and temporal lobe epilepsy]. *Rev Neurol (Paris)* 153 Suppl 1: S14-S24.
27. Bianchi R, Wong RK (1994) Carbachol-induced synchronized rhythmic bursts in CA3 neurons of guinea pig hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* 72: 131-138.
28. Blackstad TW (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* 105: 417-537.
29. Blackstad TW, Kjaerheim.A. (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* 117: 133-159.
30. Blackstad TW, Flood PR (1963) Ultrastructure of hippocampal axo-somatic synapses. *Nature* 198: 542-543.
31. Blaker SN, Armstrong DM, Gage FH (1988) Cholinergic neurons within the rat hippocampus: response to fimbria-fornix transection. *J Comp Neurol* 272: 127-138.
32. Blitzer RD, Gil O, Landau EM (1990) Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 119: 207-210.
33. Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL (1999) Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402: 297-301.
34. Boss BD, Peterson GM, Cowan WM (1985) On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 338: 144-150.
35. Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, Conn PJ (1996) Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 16: 2044-2056.
36. Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsaki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15: 47-60.
37. Brown TH, Johnston D (1983) Voltage-clamp analysis of mossy fiber synaptic input to hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 50: 487-507.
38. Brunner H, Misgeld U (1994) Muscarinic amplification of fast excitation in hilar neurones and inhibition in granule cells in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 480 (Pt 3): 513-526.

39. Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P (1994) Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71: 1289-1307.
40. Burgard EC, Sarvey JM (1990) Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 116: 34-39.
41. Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5: 390-408.
42. Buzsaki G (1984) Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol* 22: 131-153.
43. Buzsaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325-340.
44. Cajal SR (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, L. Azoulay, trans. Paris: Maloine. Translated into English as *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates* (N. Swanson and L.W. Swanson, trans.). New York: Oxford University Press.
45. Cao Y, Wilcox KS, Martin CE, Rachinsky TL, Eberwine J, Dichter MA (1996) Presence of mRNA for glutamic acid decarboxylase in both excitatory and inhibitory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9844-9849.
46. Cassell MD, Brown MW (1984) The distribution of Timm's stain in the nonsulphide-perfused human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 222: 461-471.
47. Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58: 319-379.
48. Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 11: 2795-2803.
49. Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18: 9733-9750.
50. Chavkin C (2000) Dynorphins are endogenous opioid peptides released from granule cells to act neurohumorally and inhibit excitatory neurotransmission in the hippocampus. *Prog Brain Res* 125: 363-367.

51. Chicurel ME, Harris KM (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325: 169-182.
52. Chrobak JJ, Lorincz A, Buzsaki G (2000) Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 10: 457-465.
53. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 246: 435-458.
54. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1990) Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 302: 206-219.
55. Cobb SR, Bulters DO, Davies CH (2000) Coincident activation of mGluRs and mAChRs imposes theta frequency patterning on synchronised network activity in the hippocampal CA3 region. *Neuropharmacology* 39: 1933-1942.
56. Cobb SR, Davies CH (2005) Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* 562: 81-88.
57. Cole AE, Nicoll RA (1983) Acetylcholine mediates a slow synaptic potential in hippocampal pyramidal cells. *Science* 221: 1299-1301.
58. Cole AE, Nicoll RA (1984a) Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 352: 173-188.
59. Cole AE, Nicoll RA (1984b) The pharmacology of cholinergic excitatory responses in hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* 305: 283-290.
60. Colino A, Halliwell JV (1993) Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci* 5: 1198-1209.
61. Contractor A, Swanson GT, Sailer A, O'Gorman S, Heinemann SF (2000) Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *J Neurosci* 20: 8269-8278.
62. Covolan L, Ribeiro LT, Longo BM, Mello LE (2000) Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus* 10: 169-180.
63. Crawford IL, Connor JD (1972) Zinc in maturing rat brain: hippocampal concentration and localization. *J Neurochem* 19: 1451-1458.

64. Danober L, Depaulis A, Marescaux C, Vergnes M (1993) Effects of cholinergic drugs on genetic absence seizures in rats. *Eur J Pharmacol* 234: 263-268.
65. Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE (2001) Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res* 890: 261-271.
66. Davenport CJ, Brown WJ, Babb TL (1990) Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat. *Exp Neurol* 109: 180-190.
67. Desmond NL, Levy WB (1982) A quantitative anatomical study of the granule cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. *J Comp Neurol* 212: 131-145.
68. Dichter M, Spencer WA (1969a) Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. I. Characteristics and topographical features. *J Neurophysiol* 32: 649-662.
69. Dichter M, Spencer WA (1969b) Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. II. Mechanisms underlying origin and restriction. *J Neurophysiol* 32: 663-687.
70. Dingledine R, McBain CJ (1999) Glutamate and aspartate. In: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. (Siegel G, Agranoff B, Wayne Albers R, Fisher S, Uhler M, eds), Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
71. Duffy CJ, Rakic P (1983) Differentiation of granule cell dendrites in the dentate gyrus of the rhesus monkey: a quantitative Golgi study. *J Comp Neurol* 214: 224-237.
72. During MJ, Ryder KM, Spencer DD (1995) Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* 376: 174-177.
73. Dutar P, Bassant MH, Senut MC, Lamour Y (1995) The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev* 75: 393-427.
74. Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91-100.
75. Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A (2001) Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* 21: 7993-8003.

76. Feig S, Lipton P (1993) Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism. *J Neurosci* 13: 1010-1021.
77. Fellous JM, Sejnowski TJ (2000) Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5-2 Hz), theta (5-12 Hz), and gamma (35-70 Hz) bands. *Hippocampus* 10: 187-197.
78. Ferencz I, Leanza G, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O (2000) Basal forebrain neurons suppress amygdala kindling via cortical but not hippocampal cholinergic projections in rats. *Eur J Neurosci* 12: 2107-2116.
79. Ferencz I, Leanza G, Nanobashvili A, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O (2001) Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience* 102: 819-832.
80. Ferrigan, L., Khoshnood, J., and Cobb, S. R. Isolation of a slow cholinergic synaptic response in CA1 hippocampal interneurons. 247[2]. 2003. *Soc. Neurosci. Abstract*.

Ref Type: Conference Proceeding

81. Fifkova E, Anderson CL, Young SJ, Van Harreveld A (1982) Effect of anisomycin on stimulation-induced changes in dendritic spines of the dentate granule cells. *J Neurocytol* 11: 183-210.
82. Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O (1998) Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394: 186-189.
83. Frazier CJ, Strowbridge BW, Papke RL (2003) Nicotinic receptors on local circuit neurons in dentate gyrus: a potential role in regulation of granule cell excitability. *J Neurophysiol* 89: 3018-3028.
84. Freund TF, Antal M (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336: 170-173.
85. Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.
86. Freund TF, Gulyas AI (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 479-487.
87. Friedlander MJ, Sayer RJ, Redman SJ (1990) Evaluation of long-term potentiation of small compound and unitary EPSPs at the hippocampal CA3-CA1 synapse. *J Neurosci* 10: 814-825.

88. Frotscher M (1985) Mossy fibres form synapses with identified pyramidal basket cells in the CA3 region of the guinea-pig hippocampus: a combined Golgi-electron microscope study. *J Neurocytol* 14: 245-259.
89. Frotscher M (1992) Application of the Golgi/electron microscopy technique for cell identification in immunocytochemical, retrograde labeling, and developmental studies of hippocampal neurons. *Microsc Res Tech* 23: 306-323.
90. Frotscher M, Kugler P, Misgeld U, Zilles K (1988) Neurotransmission in the hippocampus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 111: 1-103.
91. Frotscher M, Leranth C (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 239: 237-246.
92. Frotscher M, Soriano E, Misgeld U (1994) Divergence of hippocampal mossy fibers. *Synapse* 16: 148-160.
93. Frotscher M, Vida I, Bender R (2000) Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* 96: 27-31.
94. Gaarskjaer FB (1978a) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* 178: 49-72.
95. Gaarskjaer FB (1978b) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 178: 73-88.
96. Gaarskjaer FB (1985) The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *J Comp Neurol* 241: 154-170.
97. Gaarskjaer FB (1986) The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res* 396: 335-357.
98. Gaarskjaer FB, Danscher G, West MJ (1982) Hippocampal mossy fibers in the regio superior of the European hedgehog. *Brain Res* 237: 79-90.
99. Gall C, Brecha N, Karten HJ, Chang KJ (1981) Localization of enkephalin-like immunoreactivity to identified axonal and neuronal populations of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 198: 335-350.
100. Gall C, Lauterborn J (1992) The dentate gyrus: a model system for studies of neurotrophin regulation. *Epilepsy Res Suppl* 7: 171-185.

101. Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105: 521-532.
102. Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J (1990) Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 293: 103-124.
103. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204.
104. Gillespie DC, Kim G, Kandler K (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8: 332-338.
105. Giovannini MG, Mutolo D, Bianchi L, Michelassi A, Pepeu G (1994) NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. *J Neurosci* 14: 1358-1365.
106. Goda Y, Stevens CF (1996) Synaptic plasticity: the basis of particular types of learning. *Curr Biol* 6: 375-378.
107. Gomez-Lira G, Trillo E, Ramirez M, Asai M, Sitges M, Gutierrez R (2002) The expression of GABA in mossy fiber synaptosomes coincides with the seizure-induced expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse. *Exp Neurol* 177: 276-283.
108. Gonzales RB, DeLeon Galvan CJ, Rangel YM, Claiborne BJ (2001) Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 430: 357-368.
109. Green EJ, Juraska JM (1985) The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: a quantitative Golgi study. *Exp Brain Res* 59: 582-586.
110. Greenamyre JT (1986) The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch Neurol* 43: 1058-1063.
111. Grosse G, Eulitz D, Thiele T, Pahner I, Schroter S, Takamori S, Grosse J, Wickman K, Tapp R, Veh RW, Ottersen OP, Ahnert-Hilger G (2003) Axonal sorting of Kir3.3 defines a GABA-containing neuron in the CA3 region of rodent hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 24: 709-724.
112. Gulyas AI, Freund TF (1996) Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. *Hippocampus* 6: 525-534.

113. Gulyas AI, Miles R, Sik A, Toth K, Tamamaki N, Freund TF (1993) Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366: 683-687.
114. Gutierrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84: 3088-3090.
115. Gutierrez R (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87: 2562-2570.
116. Gutierrez R (2003) The GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the dentate gyrus. *Prog Neurobiol* 71: 337-358.
117. Gutierrez R (2005) **The dual glutamatergic–GABAergic phenotype of hippocampal granule cells** . *Trends in Neuroscience* 28: 297-303.
118. Gutierrez R, Heinemann U (2001) Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus--CA3 projection. *Eur J Neurosci* 13: 1371-1379.
119. Gutierrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, Vivar C, Ramirez M, Morales MA, Lamas M (2003) Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 23: 5594-5598.
120. Hajos N, Papp EC, Acsady L, Levey AI, Freund TF (1998b) Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* 82: 355-376.
121. Hajos N, Papp EC, Acsady L, Levey AI, Freund TF (1998a) Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* 82: 355-376.
122. Halasy K, Buhl EH, Lorinczi Z, Tamas G, Somogyi P (1996) Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 6: 306-329.
123. Halliwell JV (1990) Physiological mechanisms of cholinergic action in the hippocampus. *Prog Brain Res* 84: 255-272.
124. Hamlyn LH (1962) The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. *J Anat* 96: 112-120.
125. Hamlyn LH (1961) Electron microscopy of mossy fibre endings in Ammon's horn. *Nature* 190: 645-646.

126. Hamlyn.L.H. (1963) An electron microscope study of pyramidal neurons in the Ammon's horn of the rabbit. *J Anat* 97: 189-201.
127. Hasselmo ME (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 3: 351-359.
128. Hasselmo ME, Fehrlau BP (2001) Differences in time course of ACh and GABA modulation of excitatory synaptic potentials in slices of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 86: 1792-1802.
129. Hasselmo ME, Schnell E (1994) Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology. *J Neurosci* 14: 3898-3914.
130. Hasselmo ME, Schnell E, Barkai E (1995) Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci* 15: 5249-5262.
131. Hayashi Y, Momiyama A, Takahashi T, Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993) Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature* 366: 687-690.
132. Healy DJ, Meador-Woodruff JH (2000) Ionotropic glutamate receptor modulation preferentially affects NMDA receptor expression in rat hippocampus. *Synapse* 38: 294-304.
133. Henze DA, Card JP, Barrionuevo G, Ben Ari Y (1997) Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J Neurophysiol* 77: 1075-1086.
134. Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98: 407-427.
135. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
136. Hoo K, Legutko B, Rizkalla G, Deverill M, Hawes CR, Ellis GJ, Stensbol TB, Krosggaard-Larsen P, Skolnick P, Bleakman D (1999) [3H]ATPA: a high affinity ligand for GluR5 kainate receptors. *Neuropharmacology* 38: 1811-1817.
137. Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79: 69-79.

138. Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG (1995) A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 362: 17-45.
139. Jakab RL, Leranath C (1995) Septum. In: *The rat nervous system*. (Paxinos G, ed), pp 405-442. San Diego: Academic Press.
140. Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu CC, Kopke RD, Wu JY (2003) Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4293-4298.
141. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12: 1281-1289.
142. Jones LS, Grooms SY, Lapadula DM, Lewis DV (1992) Protein synthesis inhibition blocks maintenance but not induction of epileptogenesis in hippocampal slice. *Brain Res* 599: 338-344.
143. Jones S, Yakel JL (1999) Inhibitory interneurons in hippocampus. *Cell Biochem Biophys* 31: 207-218.
144. Kamiya H, Ozawa S (1999) Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CA3 synapse. *J Physiol* 518 (Pt 2): 497-506.
145. Kamiya H, Shinozaki H, Yamamoto C (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J Physiol* 493 (Pt 2): 447-455.
146. Kasyanov AM, Safiulina VF, Voronin LL, Cherubini E (2004) GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3967-3972.
147. Kawaguchi Y, Hama K (1987) Fast-spiking non-pyramidal cells in the hippocampal CA3 region, dentate gyrus and subiculum of rats. *Brain Res* 425: 351-355.
148. Koh DS, Geiger JR, Jonas P, Sakmann B (1995) Ca²⁺-permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus. *J Physiol* 485 (Pt 2): 383-402.
149. Kramis R, Vanderwolf CH, Bland BH (1975) Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior

- and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol* 49: 58-85.
150. Krnjevic K (1981a) Acetylcholine as modulator of amino-acid-mediated synaptic transmission. *Prog Clin Biol Res* 68: 127-141.
 151. Krnjevic K (1981b) Action of GABA on hippocampal neurons. *Adv Biochem Psychopharmacol* 29: 231-237.
 152. Krnjevic K (1981c) Desensitization of GABA receptors. *Adv Biochem Psychopharmacol* 26: 111-120.
 153. Krnjevic K (1993) Central cholinergic mechanisms and function. *Prog Brain Res* 98: 285-292.
 154. Krnjevic K, Reiffenstein RJ, Ropert N (1981) Disinhibitory action of acetylcholine in the rat's hippocampus: extracellular observations. *Neuroscience* 6: 2465-2474.
 155. Krnjevic K, Ropert N (1981) Septo-hippocampal pathway modulates hippocampal activity by a cholinergic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 59: 911-914.
 156. Kullmann DM (2001) Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* 32: 561-564.
 157. Laatsch RH, Cowan WM (1966) Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J Comp Neurol* 128: 359-395.
 158. Lamas M, Gomez-Lira G, Gutierrez R (2001) Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Mol Brain Res* 93: 209-214.
 159. Lanthorn TH, Ganong AH, Cotman CW (1984) 2-Amino-4-phosphonobutyrate selectively blocks mossy fiber-CA3 responses in guinea pig but not rat hippocampus. *Brain Res* 290: 174-178.
 160. Lapchak PA, Araujo DM, Collier B (1989) Regulation of endogenous acetylcholine release from mammalian brain slices by opiate receptors: hippocampus, striatum and cerebral cortex of guinea-pig and rat. *Neuroscience* 31: 313-325.
 161. Lauri SE, Segerstrale M, Vesikansa A, Maingret F, Mulle C, Collingridge GL, Isaac JT, Taira T (2005) Endogenous activation of kainate receptors regulates glutamate release and network activity in the developing hippocampus. *J Neurosci* 25: 4473-4484.

162. LaVail JH, Wolf MK (1973) Postnatal development of the mouse dentate gyrus in organotypic cultures of the hippocampal formation. *Am J Anat* 137: 47-65.
163. Lawrence JJ, McBain CJ (2003) Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci* 26: 631-640.
164. Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsaki G (1994) Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 62: 1033-1047.
165. Lehman RM, Horton T (1996) Surgical treatment of epilepsy: Robert Wood Johnson experience. *N J Med* 93: 37-45.
166. Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18: 243-255.
167. Leranth C, Frotscher M (1987) Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol* 261: 33-47.
168. Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 4: 481-495.
169. Leung LS, Martin LA, Stewart DJ (1994) Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum. *Hippocampus* 4: 136-147.
170. Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995a) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15: 4077-4092.
171. Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995c) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15: 4077-4092.
172. Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995b) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15: 4077-4092.
173. Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995d) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat

- hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15: 4077-4092.
174. Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11: 3218-3226.
 175. Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsaki G (1992) Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res* 90: 519-525.
 176. Lie AA, Becker A, Behle K, Beck H, Malitschek B, Conn PJ, Kuhn R, Nitsch R, Plaschke M, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blumcke I (2000) Up-regulation of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 in hippocampal neurons with reduced seizure vulnerability. *Ann Neurol* 47: 26-35.
 177. Linke R, Schwegler H, Boldyreva M (1994) Cholinergic and GABAergic septo-hippocampal projection neurons in mice: a retrograde tracing study combined with double immunocytochemistry for choline acetyltransferase and parvalbumin. *Brain Res* 653: 73-80.
 178. Liu Y, Waites C, Krantz D, Tan P, Edwards RH (1996) Molecular analysis of neurotransmitter transport into secretory vesicles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61: 747-758.
 179. Longo B, Covolan L, Chadi G, Mello LE (2003) Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus. *Exp Neurol* 181: 57-67.
 180. Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairen A, Lujan R (2004) Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 14: 836-848.
 181. Lowenstein DH, Arsenault L (1996) Dentate granule cell layer collagen explant cultures: spontaneous axonal growth and induction by brain-derived neurotrophic factor or basic fibroblast growth factor. *Neuroscience* 74: 1197-1208.
 182. Lubke J, Frotscher M, Spruston N (1998) Specialized electrophysiological properties of anatomically identified neurons in the hilar region of the rat fascia dentata. *J Neurophysiol* 79: 1518-1534.
 183. Maccaferri G, Toth K, McBain CJ (1998) Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science* 279: 1368-1370.
 184. Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17: 569-602.

185. MacVicar BA, Tse FW (1989) Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol* 417: 197-212.
186. Madison DV, Lancaster B, Nicoll RA (1987) Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J Neurosci* 7: 733-741.
187. Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA (1991) Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. *Annu Rev Neurosci* 14: 379-397.
188. Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354: 319-331.
189. Makuch R, Baratta J, Karaelias LD, Lauterborn JC, Gall CM, Yu J, Robertson RT (2001) Arrival of afferents and the differentiation of target neurons: studies of developing cholinergic projections to the dentate gyrus. *Neuroscience* 104: 81-91.
190. Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM (1998) Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release. *Neurochem Int* 32: 1-6.
191. Manzoni OJ, Castillo PE, Nicoll RA (1995) Pharmacology of metabotropic glutamate receptors at the mossy fiber synapses of the guinea pig hippocampus. *Neuropharmacology* 34: 965-971.
192. Maqueda J, Ramirez M, Lamas M, Gutierrez R (2003) Glutamic acid decarboxylase (GAD)67, but not GAD65, is constitutively expressed during development and transiently overexpressed by activity in the granule cells of the rat. *Neurosci Lett* 353: 69-71.
193. Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 89: 499-530.
194. Markram H, Segal M (1990) Acetylcholine potentiates responses to N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 113: 62-65.
195. Marrion NV (1997) Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59: 483-504.
196. Martin LA, Alger BE (1999) Muscarinic facilitation of the occurrence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* 92: 61-71.
197. Martin SJ (2001) Activation of metabotropic glutamate receptors induces gamma frequency oscillations in the rat dentate gyrus in vivo. *Neuropharmacology* 40: 634-637.

198. McBain CJ, Freund TF, Mody I (1999) Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci* 22: 228-235.
199. McGinty JF, Henriksen SJ, Goldstein A, Terenius L, Bloom FE (1983) Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 589-593.
200. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389: 870-876.
201. McQuiston AR, Madison DV (1999a) Muscarinic receptor activity has multiple effects on the resting membrane potentials of CA1 hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19: 5693-5702.
202. McQuiston AR, Madison DV (1999b) Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 19: 2887-2896.
203. Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815-823.
204. Milner TA, Amaral DG (1984) Evidence for a ventral septal projection to the hippocampal formation of the rat. *Exp Brain Res* 55: 579-585.
205. Min MY, Rusakov DA, Kullmann DM (1998b) Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21: 561-570.
206. Min MY, Rusakov DA, Kullmann DM (1998a) Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21: 561-570.
207. Mirsky JS, Nadkarni PM, Healy MD, Miller PL, Shepherd GM (1998) Database tools for integrating and searching membrane property data correlated with neuronal morphology. *J Neurosci Methods* 82: 105-121.
208. Mody I (2005) Aspects of the homeostatic plasticity of GABA_A receptor-mediated inhibition. *J Physiol* 562: 37-46.
209. Molnar P, Nadler JV (2001) Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Res* 910: 205-207.

210. Monaghan DT, Cotman CW (1985) Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci* 5: 2909-2919.
211. Morgado I (2005) [The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]. *Rev Neurol* 40: 289-297.
212. Morton RA, Davies CH (1997) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by adenosine receptors in the rat hippocampus. *J Physiol* 502 (Pt 1): 75-90.
213. Morton RA, Manuel NA, Bulters DO, Cobb SR, Davies CH (2001) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by GABA(B) receptors in the rat hippocampus. *J Physiol* 535: 757-766.
214. Mullany P, Lynch MA (1997) Changes in protein synthesis and synthesis of the synaptic vesicle protein, synaptophysin, in entorhinal cortex following induction of long-term potentiation in dentate gyrus: an age-related study in the rat. *Neuropharmacology* 36: 973-980.
215. Müller W, Misgeld U (1986) Slow cholinergic excitation of guinea pig hippocampal neurons is mediated by two muscarinic receptor subtypes. *Neurosci Lett* 67: 107-112.
216. Nadler JV (2003) The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res* 28: 1649-1658.
217. Naik SR, Guidotti A, Costa E (1976) Central GABA receptor agonists: comparison of muscimol and baclofen. *Neuropharmacology* 15: 479-484.
218. Nusser Z, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, Somogyi P (1996) Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11939-11944.
219. Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998) Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18: 1693-1703.
220. Nyiri G, Szabadits E, Cserep C, Mackie K, Shigemoto R, Freund TF (2005) GABAB and CB1 cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons. *Eur J Neurosci* 21: 3034-3042.
221. Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1995) Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* 360: 555-570.

222. Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1993) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 335: 252-266.
223. Olbrich HG, Braak H (1985) Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat Embryol (Berl)* 173: 105-110.
224. Olsen RW, DeLorey TM (1999) GABA and Glycine. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
225. Otani S, Roisin-Lallemand MP, Ben Ari Y (1992) Enhancement of extracellular protein concentrations during long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* 47: 265-272.
226. Palhalmi J, Paulsen O, Freund TF, Hajos N (2004) Distinct properties of carbachol- and DHPG-induced network oscillations in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 47: 381-389.
227. Palmer AM (1996) Neurochemical studies of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 5: 381-391.
228. Parra P, Gulyas AI, Miles R (1998) How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* 20: 983-993.
229. Paxinos G, Watson CR, Emson PC (1980) AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3: 129-149.
230. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE (1978) Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4: 273-277.
231. Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26.
232. Pitkanen A, Amaral DG (1993) Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: the hippocampal formation. *J Comp Neurol* 331: 37-74.
233. Pitler TA, Alger BE (1990) Activation of the pharmacologically defined M3 muscarinic receptor depolarizes hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* 534: 257-262.
234. Pitler TA, Alger BE (1992) Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol* 450: 127-142.

235. Potier S, Senecal J, Chabot JG, Psarropoulou C, Descarries L (2005) A pentylenetetrazole-induced generalized seizure in early life enhances the efficacy of muscarinic receptor coupling to G-protein in hippocampus and neocortex of adult rat. *Eur J Neurosci* 21: 1828-1836.
236. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LCLAS, McNamara JO (2001) Synaptic Transmission. In: *Neuroscience* pp 93-108. USA: Sinauer Associates.
237. Qian J, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Br J Pharmacol* 122: 511-519.
238. Qiao X, Noebels JL (1993) Developmental analysis of hippocampal mossy fiber outgrowth in a mutant mouse with inherited spike-wave seizures. *J Neurosci* 13: 4622-4635.
239. Ramirez M, Gutierrez R (2001) Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 917: 139-146.
240. Rao A, Cha EM, Craig AM (2000) Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 8344-8353.
241. Represa A, Tremblay E, Ben Ari Y (1987) Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20: 739-748.
242. Ribak CE, Anderson L (1980) Ultrastructure of the pyramidal basket cells in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 192: 903-916.
243. Rodriguez-Moreno A, Lerma J (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 20: 1211-1218.
244. Romo-Parra H, Vivar C, Maqueda J, Morales MA, Gutierrez R (2003) Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3. *J Neurophysiol* 89: 3155-3167.
245. Rouse ST, Edmunds SM, Yi H, Gilmor ML, Levey AI (2000) Localization of M(2) muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 284: 182-186.
246. Rouse ST, Levey AI (1996) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents. *J Comp Neurol* 375: 406-416.

247. Rouse ST, Levey AI (1997) Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* 380: 382-394.
248. Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI (1999) Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* 64: 501-509.
249. Rouse ST, Thomas TM, Levey AI (1997) Muscarinic acetylcholine receptor subtype, m2: diverse functional implications of differential synaptic localization. *Life Sci* 60: 1031-1038.
250. Rusakov DA, Kullmann DM, Stewart MG (1999) Hippocampal synapses: do they talk to their neighbours? *Trends Neurosci* 22: 382-388.
251. Rutecki PA, Yang Y (1997) Metabotropic glutamate receptor activation modulates epileptiform activity in the hippocampus. *Neuroscience* 81: 927-935.
252. Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13304-13309.
253. Sandler R, Smith AD (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 303: 177-192.
254. Scharfman HE (1991) Dentate hilar cells with dendrites in the molecular layer have lower thresholds for synaptic activation by perforant path than granule cells. *J Neurosci* 11: 1660-1673.
255. Scharfman HE (1995) Electrophysiological diversity of pyramidal-shaped neurons at the granule cell layer/hilus border of the rat dentate gyrus recorded in vitro. *Hippocampus* 5: 287-305.
256. Schmitz D, Mellor J, Frerking M, Nicoll RA (2001) Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11003-11008.
257. Schoepp DD, Goldsworthy J, Johnson BG, Salhoff CR, Baker SR (1994) 3,5-dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Neurochem* 63: 769-772.
258. Schwarzer C, Sperk G (1995) Hippocampal granule cells express glutamic acid decarboxylase-67 after limbic seizures in the rat. *Neuroscience* 69: 705-709.

259. Schwarzer C, Williamson JM, Lothman EW, Vezzani A, Sperk G (1995) Somatostatin, neuropeptide Y, neurokinin B and cholecystokinin immunoreactivity in two chronic models of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 69: 831-845.
260. Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurochem* 20: 11-21.
261. Segal M (1988) Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Res* 452: 79-86.
262. Semyanov A, Kullmann DM (2000) Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 25: 663-672.
263. Serra M, Dazzi L, Cagetti E, Chessa MF, Pisu MG, Sanna A, Biggio G (1997a) Effect of pentylenetetrazole-induced kindling on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *J Neurochem* 68: 313-318.
264. Serra M, Dazzi L, Pisu MG, Cagetti E, Biggio G (1997b) Reversal of a selective decrease in hippocampal acetylcholine release, but not of the persistence of kindling, after discontinuation of long-term pentylenetetrazol administration in rats. *Brain Res* 751: 175-179.
265. Sheline YI, Mittler BL, Mintun MA (2002) The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry* 17 Suppl 3: 300-305.
266. Shepherd GM (1996) The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. *J Neurophysiol* 75: 2197-2210.
267. Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7503-7522.
268. Shigemoto R, Kulik A, Roberts JD, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T, Somogyi P (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381: 523-525.
269. Shimono K, Brucher F, Granger R, Lynch G, Taketani M (2000) Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J Neurosci* 20: 8462-8473.
270. Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795-816.

271. Sik A, Penttonen M, Buzsaki G (1997) Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur J Neurosci* 9: 573-588.
272. Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G (1995) Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 15: 6651-6665.
273. Sik A, Ylinen A, Penttonen M, Buzsaki G (1994) Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science* 265: 1722-1724.
274. Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373: 593-618.
275. Soghomonian JJ, Martin DL (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19: 500-505.
276. Soltesz I, Haby M, Leresche N, Crunelli V (1988) The GABAB antagonist phaclofen inhibits the late K⁺-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurones. *Brain Res* 448: 351-354.
277. Somogyi P, Fritschy JM, Benke D, Roberts JD, Sieghart W (1996) The gamma 2 subunit of the GABA_A receptor is concentrated in synaptic junctions containing the alpha 1 and beta 2/3 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus. *Neuropharmacology* 35: 1425-1444.
278. Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26.
279. Soriano E, Frotscher M (1989) A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res* 503: 170-174.
280. Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 551: 927-943.
281. Squire LR (1998) Memory systems. *C R Acad Sci III* 321: 153-156.
282. Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269: 977-981.
283. Stewart M, Fox SE (1990) Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci* 13: 163-168.

284. Swann JW, Smith KL, Brady RJ (1990) Neural networks and synaptic transmission in immature hippocampus. *Adv Exp Med Biol* 268: 161-171.
285. Swanson LW, Simmons DM, Whiting PJ, Lindstrom J (1987) Immunohistochemical localization of neuronal nicotinic receptors in the rodent central nervous system. *J Neurosci* 7: 3334-3342.
286. Szeideemann Z, Jakab RL, Shanabrough M, Leranth C (1995) Extrinsic and intrinsic substance P innervation of the rat lateral septal area calbindin cells. *Neuroscience* 69: 1205-1221.
287. Taupin P, Ben Ari Y, Roisin MP (1994a) Subcellular fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: evoked release of glutamate, GABA, aspartate and glutamate decarboxylase activity in control and degranulated rat hippocampus. *Brain Res* 644: 313-321.
288. Taupin P, Zini S, Cesselin F, Ben Ari Y, Roisin MP (1994b) Subcellular fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: morphological and biochemical characterization in control and degranulated rat hippocampus. *J Neurochem* 62: 1586-1595.
289. Terrian DM, Johnston D, Claiborne BJ, Ansah-Yiadom R, Strittmatter WJ, Rea MA (1988) Glutamate and dynorphin release from a subcellular fraction enriched in hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Bull* 21: 343-351.
290. Thompson RF (2005) In search of memory traces. *Annu Rev Psychol* 56: 1-23.
291. Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, Koyano K, Hashimoto N (2000) Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol* 165: 66-76.
292. Tombol T, Somogyi G, Hajdu F, Madarasz M (1978) Granule cells, mossy fibres and pyramidal neurons: an electron microscopic study of the cat's hippocampal formation, I. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 26: 291-310.
293. Tonder N, Kragh J, Finsen BR, Bolwig TG, Zimmer J (1994) Kindling induces transient changes in neuronal expression of somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin in adult rat hippocampus and fascia dentata. *Epilepsia* 35: 1299-1308.
294. Tong G, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* 16: 1147-1157.

295. Toselli M, Lang J, Costa T, Lux HD (1989) Direct modulation of voltage-dependent calcium channels by muscarinic activation of a pertussis toxin-sensitive G-protein in hippocampal neurons. *Pflugers Arch* 415: 255-261.
296. Toth K, Soares G, Lawrence JJ, Philips-Tansey E, McBain CJ (2000) Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *J Neurosci* 20: 8279-8289.
297. Turek JW, Kang CH, Campbell JE, Arneric SP, Sullivan JP (1995) A sensitive technique for the detection of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, methyllycaconitine, in rat plasma and brain. *J Neurosci Methods* 61: 113-118.
298. Valentino RJ, Dingledine R (1981) Presynaptic inhibitory effect of acetylcholine in the hippocampus. *J Neurosci* 1: 784-792.
299. Vicario-Abejon C, Collin C, Tsoufas P, McKay RD (2000) Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* 12: 677-688.
300. Vida I, Frotscher M (2000) A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1275-1280.
301. Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388: 179-182.
302. Vivar C, Gutierrez R (2005) Blockade of the membranal GABA transporter potentiates GABAergic responses evoked in pyramidal cells by mossy fiber activation after seizures. *Hippocampus* 15: 281-284.
303. Vogt KE, Nicoll RA (1999) Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1118-1122.
304. Vogt KE, Regehr WG (2001) Cholinergic modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 area of the hippocampus. *J Neurosci* 21: 75-83.
305. Wainer BH, Bolam JP, Freund TF, Henderson Z, Totterdell S, Smith AD (1984) Cholinergic synapses in the rat brain: a correlated light and electron microscopic immunohistochemical study employing a monoclonal antibody against choline acetyltransferase. *Brain Res* 308: 69-76.
306. Walker MC, Ruiz A, Kullmann DM (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29: 703-715.
307. Wasterlain CG, Jonec V (1983) Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. *Brain Res* 271: 311-323.

308. Weisskopf MG, Nicoll RA (1995) Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature* 376: 256-259.
309. Wenk GL, Stoehr JD, Quintana G, Mobley S, Wiley RG (1994) Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192 IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats. *J Neurosci* 14: 5986-5995.
310. Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1997) Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12676-12681.
311. West JR, Van Hoesen GW, Kosel KC (1982) A demonstration of hippocampal mossy fiber axon morphology using the anterograde transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 48: 209-216.
312. Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG (1995) Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373: 612-615.
313. Williams RS, Matthysse S (1983) Morphometric analysis of granule cell dendrites in the mouse dentate gyrus. *J Comp Neurol* 215: 154-164.
314. Williams S, Johnston D (1990) Muscarinic depression of synaptic transmission at the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurophysiol* 64: 1089-1097.
315. Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201: 160-163.
316. Witter MP, Amaral DG (1991) Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol* 307: 437-459.
317. Woolf NJ (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37: 475-524.
318. Wu Y, Ali S, Ahmadian G, Liu CC, Wang YT, Gibson KM, Calver AR, Francis J, Pangalos MN, Carter SO, III (2004) gamma-Hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-aminobutyric acid(B) receptor (GABA(B)R) binding sites are distinctive from one another: molecular evidence. *Neuropharmacology* 47: 1146-1156.
319. Xiang Z, Greenwood AC, Kairiss EW, Brown TH (1994) Quantal mechanism of long-term potentiation in hippocampal mossy-fiber synapses. *J Neurophysiol* 71: 2552-2556.

320. Yakel JL, Shao Z (2004) Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat hippocampal interneurons. *Prog Brain Res* 145: 95-107.
321. Yamamoto C (1972) Activation of hippocampal neurons by mossy fiber stimulation in thin brain sections in vitro. *Exp Brain Res* 14: 423-435.
322. Yan XX, Spigelman I, Tran PH, Ribak CE (2001) Atypical features of rat dentate granule cells: recurrent basal dendrites and apical axons. *Anat Embryol (Berl)* 203: 203-209.
323. Zalutsky RA, Nicoll RA (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248: 1619-1624.
324. Zalutsky RA, Nicoll RA (1992) Mossy fiber long-term potentiation shows specificity but no apparent cooperativity. *Neurosci Lett* 138: 193-197.
325. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1989) Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair memory or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *J Neurosci* 9: 1922-1936.