

14  
2ejº



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CONDUCTANCIAS DE CALCIO PRESENTES EN LAS  
AFERENTES GLUTAMATERGICAS QUE PROYECTAN  
AL NEOESTRIADO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

GABRIELA XOCHITL AYALA MENDEZ



MEXICO, D.F.,



MAYO DE 1996

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

CONDUCTANCIAS DE CALCIO PRESENTES EN LAS AFERENTES GLUTAMATERGICAS QUE  
PROYECTAN AL NEOESTRIADO DE LA RATA.

realizado por GABRIELA XOCHITL AYALA MENDEZ

con número de cuenta 8839962-3 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

DR. JOSE BARGAS DIAZ

*Jose Bargas*

Propietario

DRA. HORTENCIA GONZALEZ GOMEZ

Propietario

M. EN IBB. JORGE ALBERTO PEREZ LEON

*Jorge Alberto Perez Leon*

Suplente

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

*Rocio Salceda*

Suplente

DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES

*Jesus Manuel Leon Cazares*

Consejo Departamental de Biología

*Alejandro Martinez Mena*  
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz.

Durante el desarrollo experimental se contó con el apoyo económico otorgado por la Fundación U.N.A.M., en el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura.

## AGRADECIMIENTOS

En primer término, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Bargas Díaz, por sus consejos, apoyo y paciencia que en todo momento me brinda. A la Dra. Elvira Galarraga Palacios, porque siempre nos apoya para llevar a cabo nuestros proyectos de investigación.

A los sinodales:

Dra. Hortencia González Gómez; M. en IBB Jorge Alberto Pérez León; Dra. Rocío Salceda Sacanelles y al Dr. Jesús Manuel León Cázares.

Por sus valiosas observaciones para la edición final del presente trabajo.

### **DEDICO ESTA TESIS:**

Con amor, a mis padres Miguel Ayala González y Angela Méndez Velazco, gracias por su cariño, su confianza, sus ejemplos, y por darnos siempre lo mejor de si mismos.

A mis hermanos: Miguel, Marina, Georgina, Guillermo, Araceli, Armando, Yolanda y Betito. Porque siempre estamos juntos en las buenas y en las malas. Gracias por apoyarme en todo momento.

A mis queridos sobrinitos: Iriana, René, Jonathan, Norma, Diana, Ivan, Miguel. Itzayana, Mayra, Armando, Laura, César, Brenda, Cinthya y Sandra. Ustedes son la alegría y el futuro de la familia. Los quiero mucho.

A mis amigos de siempre: Ma. de Jesús, Josefina, Verónica, Liliana, Elizabeth, Martha, Claudia Ivette, Maricarmen, Gabino, Fabian y Julio.

Porque aún con el paso del tiempo, seguimos manteniendo viva nuestra amistad.

A mis amigos y compañeros del Instituto: Ericka, Rodrigo, Jaime, Arturo, Beto, Elizabeth, Salvador, Wendy, Carolina, Javier, Celia, Alejandra, Juanito.

Por todos los momentos agradables que he pasado en su compañía, y por la ayuda que nos proporcionamos unos a otros para funcionar como un buen equipo.

De manera especial, agradezco a Carmen Vilchis, mi amiga y compañera de trabajo, por su amistad, paciencia y confianza; y porque es una persona muy especial, que siempre está dispuesta a escucharnos y ayudarnos a todos los que nos encontramos en el laboratorio. Que gusto haberte conocido.

A Jorge Flores Hernández, por su amistad y todos los momentos agradables que compartimos contigo. Ojalá regreses pronto.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>Ganglios basales</b> .....	1
<b>Elementos neuronales del neocstriado</b> .....	3
<b>Neuronas principales</b> .....	3
<b>Interneuronas</b> .....	4
<b>Interneurona gigante sin espinas</b> .....	5
<b>Interneuronas medianas</b> .....	5
<b>Axones eferentes</b> .....	6
<b>Neurotransmisores</b> .....	6
<b>Interneuronas</b> .....	7
<b>Fibras aferentes</b> .....	7
<b>Conexiones sinápticas</b> .....	8
<b>Conexiones corticales y talámicas</b> .....	8
<b>Receptores al glutamato</b> .....	9
<b>Circuito básico</b> .....	10
<b>Patrón de disparo de las neuronas espinosas</b> .....	11
<b>Potencial de campo</b> .....	14
<b>Componentes sinápticos poblacionales en el neocstriado</b> .....	17
<b>La transmisión sináptica</b> .....	20

<b>El calcio y la liberación del neurotransmisor.....</b>	<b>20</b>
<b>Estructura molecular de los canales de calcio.....</b>	<b>23</b>
<b>Clasificación de los canales de calcio.....</b>	<b>23</b>
Voltaje de activación.....	24
Propiedades cinéticas.....	24
Sensibilidad a antagonistas.....	25
<b>Regulación de los canales de calcio .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>31</b>
<b>METODOS .....</b>	<b>32</b>
Obtención de las rebanadas.....	32
Obtención de los registros.....	32
Extracelular.....	32
Intracelular.....	34
Pulsos pareados.....	34
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
Caracterización de los componentes sinápticos.....	36
Efectos de los antagonistas glutamatérgicos y gabaérgicos sobre el potencial sináptico $N_2$ .....	36
Efecto del cadmio sobre la actividad glutamatérgica.....	39
Acción de las toxinas bloqueadoras de canales de calcio tipo N y P sobre la actividad sináptica de las aferentes glutamatérgicas neoesriatales .....	42

Efecto de la $\omega$ -conotoxina MV11C en el potencial sináptico N <sub>2</sub> .....	46
Efecto de la calciseptina en el potencial sináptico N <sub>2</sub> .....	46
Efectos aditivos de los bloqueadores específicos de canales tipo P y N.....	47
Efectos en la facilitación sináptica.....	50
<b>DISCUSION</b> .....	53
La actividad sináptica de las aferentes excitatorias es mediada por glutamato.....	53
Acciones de las toxinas bloqueadoras de los canales de calcio sobre el potencial ortodrómico.....	53
Efectos aditivos de la $\omega$ -agatoxina y $\omega$ -conotoxina en el neocstriado.....	58
<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	63

## INTRODUCCIÓN

### GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que se expanden a través del telencéfalo, diencefalo y cerebro medio; se encuentran en reptiles, aves y mamíferos, donde ocupan un gran volumen del prosencéfalo (Wilson, 1990). Las estructuras que lo forman están relacionadas con el control de los movimientos voluntarios.

La neocorteza manda aferentes hacia el neostriado, núcleo que procesa la información y la transmite a otras regiones de los ganglios basales, los cuales mandan eferentes hacia el tálamo, y de ahí hacia la corteza frontal, a la que se relaciona con la regulación y ejecución de los movimientos. No se conoce con detalle el funcionamiento de estos circuitos subcorticales, pero hay hipótesis basadas en descripciones de alteraciones clínicas, como la enfermedad del Parkinson. En ésta, degeneran las proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales, que modulan los circuitos estriatales (Graybiel et al., 1994).

En primates, la salida de los ganglios basales es por eferentes del globo pálido interno (GPI) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr), los cuáles mandan sus axones hacia el tálamo y al colículo superior. También hay salidas al núcleo pedúnculo pontino (PPN). Las proyecciones del tálamo se continúan hacia la corteza cerebral y se dirigen a las áreas motoras y prefrontales por lo que se sugiere que los ganglios basales no solo

intervienen en el control motor voluntario, sino también en aprendizaje, secuencia motora y motivación; funciones superiores llevadas a cabo en las áreas corticales.

Los ganglios basales están formados por las siguientes núcleos:

- Caudado (Cd)
- Putamen (Put)
- Núcleo acumbens
- Globo pálido, externo, interno y ventral (GPe, GPi, GPv)
- Substancia nigra reticulata y compacta (SNr, SNc)
- Núcleo subtalámico (STN)
- Núcleos pedúnculo pontinos (PPN)

Los núcleos caudado y putamen reciben entradas de áreas corticales sensoriales, motoras y de asociación, a la vez que entradas de los núcleos talámicos intralaminares, entradas dopaminérgicas de la SNc y entradas serotonérgicas de los núcleos del rafe.

Algunas conexiones similares junto con las provenientes de la corteza límbica y del hipocampo son aferentes del núcleo acumbens.

Los núcleos caudado, putamen y acumbens forman el neostriado. En gran parte, el tamaño de los ganglios basales está dado por el neostriado.

Este proyecta hacia otras estructuras de los ganglios basales, y tiene cuatro blancos principales:

- GPi, GPe, SNr, SNc.

El GPi y la SNr proyectan hacia fuera de los ganglios basales y dan lugar a la salida principal. Sus blancos son principalmente los núcleos ventrales del tálamo, los cuáles proyectan hacia la corteza frontal y el núcleo lateral habenular. Además, hay una salida de la SNr hacia el colículo superior.

El GPe proyecta hacia el STN, un componente pequeño pero importante de los ganglios basales, que proyecta hacia el GPi y la SNr.

## ELEMENTOS NEURONALES DEL NEOSTRIADO

### NEURONAS PRINCIPALES

Las neuronas principales del neostriado se conocen como neuronas espinosas medianas, debido al gran número de espinas dendríticas que presentan (DiFiglia et al., 1976; Wilson y Groves, 1980 ), constituyen el 95% de la población neuronal.

Las neuronas espinosas fueron de las primeras células anatómicamente estudiadas por inyección intracelular de peroxidasa de rábano (Kitai et al., 1976).

Son neuronas con soma de 12 a 18  $\mu\text{m}$  de diámetro, del cual surge un pequeño número de troncos dendríticos principales con diámetros de 1 a 2  $\mu\text{m}$ ; la porción inicial de estos y los somas están generalmente libres de espinas (Fig 1).

Una neurona espinosa generalmente presenta 20 a 30 ramas terminales dendríticas que irradian en todas direcciones dando un volúmen con diámetro de 300 a 500  $\mu\text{m}$ . La densidad de espinas de estas dendritas es una de las mayores encontradas en el cerebro, de 4 a 6 por  $\mu\text{m}$  de longitud.

El axón se origina en el segmento inicial del soma o en uno de los troncos dendríticos proximales. Este emite múltiples colaterales, antes de alejarse totalmente del soma, y puede formar sinapsis con dendritas, somas o cuerpos celulares de otras neuronas espinosas o interneuronas (Bolam et al., 1986) (Fig 1).

### **INTERNEURONAS**

Los estudios anatómicos por medio de la técnica de Golgi revelan varios tipos neuronales sin espinas que son un pequeño porcentaje del total de las neuronas neocorticales. Por lo menos se han descrito tres tipos neuronales, en base a su morfología y al tipo de neurotransmisor que sintetizan, y son los siguientes:

- Interneurona gigante sin espinas: colinérgica
- Interneuronas medianas escasamente espinosas: GABAérgicas
- Interneuronas medianas lisas y con dendritas varicosas: GABAérgicas

### **INTERNEURONA GIGANTE SIN ESPINAS**

Representan menos del 2% de las células del neocórtex. Son células fusiformes con un diámetro mayor de 50 a 60  $\mu\text{m}$  y menor de 15 a 25  $\mu\text{m}$ . Presentan pocas dendritas, que pueden extenderse hasta 500 ó 750  $\mu\text{m}$  del soma (Fig 1).

Los axones derivan de los troncos dendríticos principales, generalmente están mielinizados en las primeras porciones, pero la mielina se pierde con la reducción del diámetro del axón cuando ocurren bifurcaciones repetidas que forman plexos densos que cubren los campos dendríticos de las neuronas circundantes.

## INTERNEURONAS MEDIANAS

Son células con tamaño semejante a las neuronas espinosas y representan el 3% de la población neocortical. Se tienen dos clases, unas que presentan dendritas lisas con apéndices semejantes a espinas y terminaciones finas que irradian en forma de un penacho, que corresponde al tipo I de DiFiglia et al. (1976) y a las neuronas tipo III/IV de la clasificación de Chang et al., (1982). El otro tipo de neurona posee varicosidades prominentes que corresponden al tipo III de DiFiglia y al tipo V de Chang. Ambos tipos de neuronas pueden presentar dendritas escasamente espinosas y cubrir un volumen semejante al de las neuronas espinosas medianas (300 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro).

## AXONES EFERENTES

Existen al menos dos diferentes tipos de fibras que derivan de las neuronas espinosas. Un tipo proviene de neuronas que arborizan su axón en el segmento externo del globo pálido, mientras que otro tipo lo arboriza en el segmento interno del globo pálido y la sustancia nigra *pars reticulata* (Chang et al., 1981). Estos axones arborizan en un patrón sináptico longitudinal axodendrítico, i.e, los axones corren paralelamente hacia las dendritas de las neuronas del pálido y la nigra (DiFiglia y Rafols, 1988).

En las ratas se observa que los axones están mielinizados en las porciones más cercanas al soma ( los primeros 0.25  $\mu\text{m}$  ) y en adelante la mielina se va perdiendo. En los primates los axones están mielinizados a mayores distancias, aunque todo esto varía según la especie de que se trate.

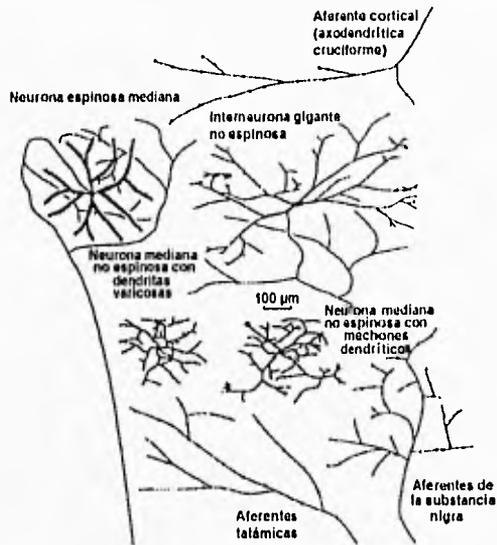


Figura 1. Neuronas presentes en el neocórtex. Tomado de Wilson, 1990

## NEUROTRANSMISORES

### NEURONA ESPINOSA.

El neurotransmisor que sintetiza la neurona espinoza mediana es el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Fisher et al., 1986; Kita y Kitai, 1988) además de que se han localizado varios neuropéptidos como dinorfina (DYN), sustancia P (SP) y encefalinas (ENK), con distribución específica según el núcleo al que proyecten las neuronas. Las encefalinas están presentes en grandes cantidades en las neuronas espinosas que

proyectan hacia el GPe, mientras que la sustancia P y la dinorfina están en mayor cantidad en las neuronas que proyectan hacia la SNr (Graybiel, 1990)

## **INTERNEURONAS**

La interneurona gigante sin espinas es colinérgica. Aunque son pocas en número, sus arborizaciones axonales son grandes y densas por lo que dan una innervación rica en el neocóstriado (Bolam et al., 1984; Phelps et al., 1985).

Las dos clases de interneuronas medianas sin espinas son gabaérgicas (Bolam et al., 1983; Oertel y Mugnaini, 1984; Kawaguchi 1993; Kita, 1993), y contienen proteínas amortiguadoras de calcio, llamadas parvalbúmina y calsequestrina.

La parvalbúmina se encuentra en las interneuronas de disparo rápido de la sustancia nigra y el globo pálido.

Algunas interneuronas medianas contienen una alta concentración del péptido somatostatina (DiFiglia y Aronin, 1982; Takagi et al., 1983 ).

## **FIBRAS AFERENTES**

El neurotransmisor de la vía corticoestriatal es el glutamato (McGeer et al., 1977, 1993). Hasta ahora no se sabe cual es el neurotransmisor de las aferentes talamoestriatales, pero se sospecha que también es el glutamato. La proyección nigroestriatal es dopaminérgica y la entrada del núcleo del rafe, serotonérgica.

## CONEXIONES SINAPTICAS

### CONEXIONES CORTICALES Y TALAMICAS

Los axones de la corteza cerebral y del tálamo forman sinapsis asimétricas con las espinas dendríticas de las neuronas espinosas neocorticales. Este tipo de sinapsis constituye el 85% de todas las sinapsis encontradas en el neocórtex (Kemp y Powell, 1971).

Las aferentes cortico-estriatales son bilaterales y se originan, en la rata y el mono, de células piramidales de la capa V y VI (McGeorge y Faulk, 1989).

En el gato, la mayoría de las neuronas de proyección que van hacia el neocórtex se localizan en las capas II y III, V y VI (Royce, 1982; Royce y Bromley, 1984; Arikuni y Kubota, 1986; Gerfen, 1984, 1990).

En todas las especies estudiadas, las aferentes cortico-estriatales glutamatérgicas forman la mayoría de los contactos con las espinas de las neuronas espinosas. Se ha calculado que la cantidad de contactos generados por cada fibra aferente es de 1 a 4 botones por cada neurona espinosa mediana (Mori et al., 1994; Wilson, 1994). Estas aferentes también forman sinapsis con dendritas de neuronas sin espinas (Wilson, 1990).

## RECEPTORES AL GLUTAMATO.

Se conocen varios tipos de receptores al glutamato.

Los receptores ionotrópicos que pueden dividirse en:

-Los Receptores tipo N- metil-D-aspartato (NMDA), bloqueados por MK-801 y ácido-2-amino-5- fosfoaléxico ( APV).

-Los Receptores tipo No-NMDA, que a su vez pueden dividirse de acuerdo a sus agonistas selectivos, en:

-Los receptores tipo ácido quisqualico/ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5- metil-4-isoxazolepropionico (QA/AMPA), bloqueados por 6- ciano-7- nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX).

- Los receptores al ácido kainico (KA)

Además, hay varios tipos de receptores metabotrópicos, que son aquellos que activan proteínas G y cadenas de señales intracelulares entre los que destaca el receptor metabotrópico al ácido L-aminofosfonobutírico (AP4).

Existe colocalización de los múltiples tipos de receptores, principalmente de los ionotrópicos a NMDA y a no NMDA. En condiciones de reposo, el receptor tipo NMDA está bloqueado de manera dependiente del voltaje por iones  $Mg^{2+}$ . Se activa cuando la membrana se despolariza lo que ocasiona la salida del  $Mg^{2+}$  (Siegel et al, 1994). Los registros *in vitro* muestran que con estimulación intraestriatal se provocan potenciales sinápticos que poseen componentes mediados por aminoácidos excitatorios y por GABA (Cherubini et al., 1988; Calabresi et al., 1990).

Al estimular con un sólo pulso en el cuerpo caloso, o cápsula externa, se provocan potenciales despolarizantes con duración de 20 a 150 mseg, y latencias de 2 a 5 mseg que se mantienen constantes aunque la intensidad del estímulo varíe. Las amplitudes son de 2 a 24 mV según la intensidad de estimulación y los sitios de registro (Jiang y North, 1990). Los potenciales sinápticos excitatorios (EPSPs) son eliminados por una combinación de antagonistas glutamatérgicos como el CNQX, que bloquea el EPSP en un 90%, y el APV que bloquea lo restante, aunque hay evidencias de receptores metabotrópicos a glutamato (Lovinger et al., 1993).

### CIRCUITO BASICO

La figura 2 muestra dos neuronas espinosas con sus colaterales axónicas que dan lugar a sinapsis inhibitorias entre ellas mismas y en los sitios de proyección (globo pálido y substancia nigra pars reticulata). Se muestra además una interneurona gigante sin espinas y una interneurona mediana que establece sinapsis en el árbol dendrítico y el soma de las neuronas espinosas.

Tanto por los efectos directos de las interneuronas medianas en las células espinosas, (Flores-Hernández et al., 1994), como por su morfología y distribución de las sinapsis con las neuronas espinosas, estas neuronas son inhibitorias. En la figura se representa un tipo de interneurona mediana inhibitoria con dendritas varicosas.

Las entradas aferentes llegan principalmente a las espinas dendríticas de las neuronas espinosas, se incluyen las de la corteza cerebral y el tálamo.

## PATRON DE DISPARO DE LAS NEURONAS ESPINOSAS

Las neuronas neocorticales de proyección presentan un patrón peculiar de actividad espontánea, caracterizada por periodos largos de silencio interrumpidos por periodos de actividad que duran desde cientos de milisegundos a segundos. Este patrón ha sido descrito en animales anestesiados y es la actividad clásica de este tipo celular (Wilson, 1993). Se tienen dos potenciales de membrana preferenciales, uno llamado "up state" entre -50 ó -55 mV, donde aparecen potenciales de acción, y otro llamado "down state" a un potencial de membrana de -80 mV en donde las neuronas permanecen silentes. Estos patrones de disparo son regulados por las aferentes corticales que proyectan hacia estas neuronas en registros *in vivo* (Wilson, 1993).

En registros de rebanadas de cerebro de rata *in vitro*, se tiene un potencial de membrana de -84 mV, (Galarraga et al 1994; Bargas et al., 1988) ya que la ruptura de las aferentes corticales durante la obtención de las rebanadas mantiene a las células en "down state" (Wilson, 1993).

En estudios *in vitro* del neocórtico en donde se utilizó 4-aminopiridina (4-AP), bloqueador de canales de potasio que actúa en aferentes presinápticas para liberar el neurotransmisor, se encontró que la actividad sináptica inducida por éste fármaco, es totalmente bloqueada por CNQX y APV, antagonistas de receptores ionotrópicos a glutamato (Flores Hernández et al., 1994), se sugiere que el glutamato es necesario en la activación de las neuronas espinosas medianas (Flores Hernández et al., 1994).

Por otro lado, las neuronas del globo pálido y la sustancia nigra *pars reticulata* disparan todo el tiempo a frecuencias altas. Esto ocasiona una inhibición tónica en el disparo de las neuronas del tálamo y del colículo superior. Con el disparo de las neuronas neocorticales se da una inhibición de las neuronas del globo pálido y de la sustancia nigra *pars reticulata*. Esto produce una desinhibición de las neuronas talámicas y coliculares. Las interneuronas ayudan a regular la duración, fuerza y patrón espacial de esta desinhibición (Wilson, 1990).

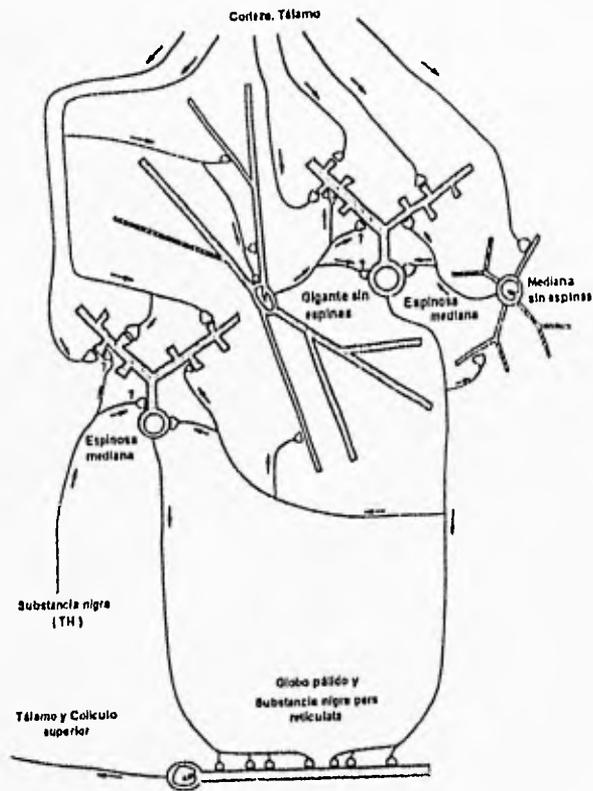


Figura 2. Circuito básico en el neocórtex. Se muestran las entradas excitatorias glutamatergicas que provienen de la corteza y el tálamo, hacia las neuronas e interneuronas del neocórtex. Obsérvese que estas entradas llegan al soma y el árbol dendrítico de las neuronas espinosas medianas. Las neuronas espinosas medianas proyectan eferentes inhibitorias hacia otras neuronas espinosas, al globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticulata. Se observa la presencia de una interneurona mediana sin espinas, que proyecta aferentes inhibitorias hacia la neurona espinoza. La interneurona gigante sin espinas también proyecta sus aferentes a las neuronas espinosas. Las neuronas de la sustancia nigra pars compacta proyecta aferentes hacia el soma y el árbol dendrítico de las neuronas espinosas. Los signos de interrogación significan que se desconoce el efecto de estas entradas sinápticas sobre las neuronas espinosas.

## POTENCIAL DE CAMPO

Los potenciales de campo son registros extracelulares de corrientes iónicas, que nos indican cambios de éstas en un volumen conductor representado por el entorno extracelular. Estas señales son generadas por grupos de neuronas.

En la figura 3, se muestra la propagación de un potencial de acción a lo largo de un axón y las corrientes iónicas extracelulares que se registran cuando se coloca un electrodo de baja resistencia sobre el mismo.

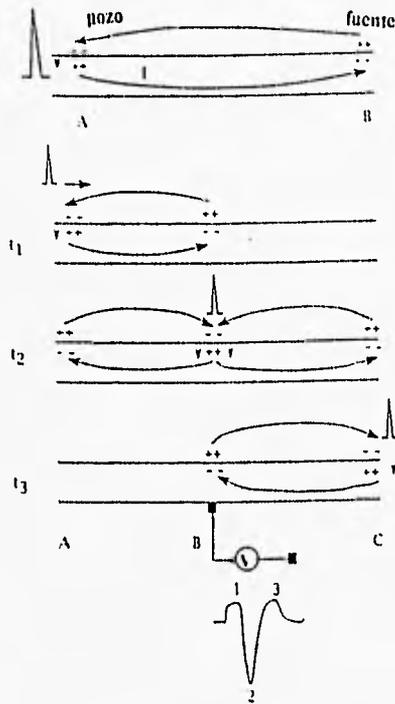


Figura 3. Propagación del potencial de acción a lo largo del axón  
Tomado de Johnston y Sin Wu 1995.

El potencial de acción registrado extracelularmente es una onda trifásica y se obtiene de la siguiente manera:

El punto en el cual la corriente fluye hacia el interior del axón se le denomina pozo y el punto por donde esta sale, fuente. En la parte superior se muestra la generación de el potencial de acción en el axón, en las figuras inferiores ( $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ) se observa como se propaga con el tiempo. Por acuerdo, en un registro extracelular una onda hacia arriba es positiva (+) y representa una corriente saliente, mientras que una onda hacia abajo es negativa (-) y representa una corriente entrante. Si se registra en el punto B, las corrientes entrantes activas o pozos (originadas por apertura de canales sensibles a voltaje), van a desplazarse hacia ambos lados del axón y originan corrientes salientes pasivas o fuentes, por redistribución de cargas en la membrana celular. Como el flujo de corriente va de positivo a negativo, las cargas positivas se dirigen nuevamente hacia el pozo para cerrar el circuito.

Como estas corrientes cambian con el tiempo, es común obtener ondas trifásicas en registros extracelulares, que representan la propagación del potencial de acción de varios axones a la vez.

Al soma de la neurona se le considera un dipolo eléctrico (Fig 4) debido a que durante la generación del potencial de acción en el soma se da lugar a una corriente activa, mientras que en las dendritas se da una corriente pasiva, por lo que las dendritas son positivas con respecto al soma. Las aferentes sinápticas dan lugar a cambios en estas corrientes. Las entradas sinápticas en las dendritas dan lugar a una corriente activa, y en el soma a una pasiva; mientras que las entradas sinápticas en el soma dan lugar a una corriente activa en éste y a una pasiva en las dendritas.

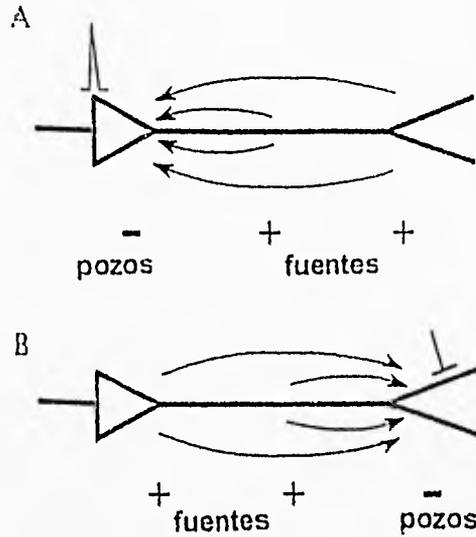


Figura 4. "Pozos" y "fuentes" de corriente en neuronas con dendritas. En A se observa un potencial de acción originado en el soma. En B se muestra una entrada sináptica excitatoria en las dendritas. Las flechas indican la dirección que sigue la corriente extracelular. Tomado de Johnston y Sin Wu 1995.

Las neuronas pueden representarse como dipolos, los cuáles tridimensionalmente forman estratos o capas. La manera de medir las corrientes iónicas extracelulares de estos dipolos es por ángulos sólidos. El ángulo sólido es el equivalente tridimensional de un ángulo plano. Su valor depende de la distancia que exista entre los dipolos, de sus tamaños y del punto de referencia u observación en que se encuentre el observador.

El potencial registrado con respecto a la tierra dependerá del ángulo sólido y del arreglo geométrico de las neuronas registradas (Fig 5).

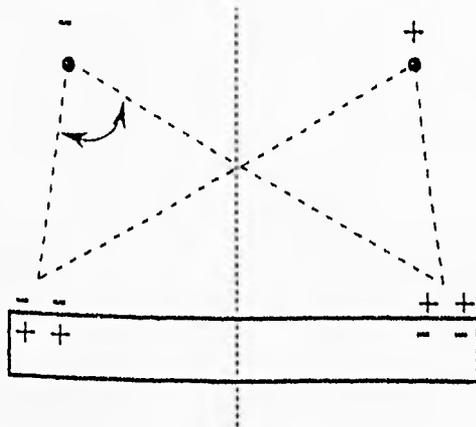


Figura 5. Campo eléctrico en un volumen conductor. El rectángulo nos representa un tejido nervioso como un dipolo. Los dos círculos nos representan dos puntos de observación, las líneas discontinuas representan el ángulo sólido y la línea media nos representa cero potencial. Tomado de Johnston, 1995.

## COMPONENTES SINAPTICOS POBLACIONALES EN EL NEOESTRIADO

En el neocóstriado se obtienen dos componentes poblacionales en el potencial de campo, uno antidrómico y otro ortodrómico. Ambos se observan cuando se estimulan las aferentes corticales del cuerpo caloso, o se estimula intraestriatalmente en rebanadas de cerebro de rata. (Lovinger et al., 1993).

Un potencial antidrómico se origina cuando se estimula eléctricamente el axón y el potencial de acción generado viaja hacia el soma. El potencial ortodrómico se obtiene cuando se estimulan aferentes que llegan al árbol dendrítico o soma neuronal y al

generarse el potencial sináptico, este viaja hacia el axón, sitio donde se genera el potencial de acción.

En el neocóstriado, el componente antidrómico se llama  $N_1$ , y se origina por la estimulación de los axones, ya que estas células emiten colaterales múltiples antes de alejarse del soma neuronal. El componente ortodrómico se conoce como  $N_2$  y es mediado por la transmisión sináptica. (Yakamoto 1973; Misgeld y Hassher 1979; Cordingle y Weight, 1986) (Fig 6).

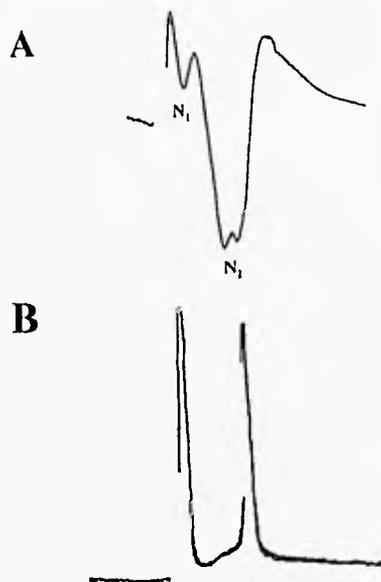


Figura 6. Componente antidrómico  $N_1$  y ortodrómico  $N_2$  poblacional del neocóstriado registrados con potencial de campo (A). Registros intracelulares de potenciales de acción antidrómico y ortodrómico respectivamente (B).

Las evidencias que soportan el origen sináptico del componente poblacional  $N_2$  son las siguientes:

- Las bajas concentraciones de calcio lo bloquean.
- Los potenciales de acción ortodrómicos obtenidos de registro intracelular muestran latencias similares al potencial sináptico obtenido extracelularmente (Fig 6).
- El potencial poblacional es bloqueado en su totalidad con la combinación de antagonistas glutamatérgicos ionotrópicos (CNQX y APV) (Lovinger et al., 1993).

La estimulación de campo sincroniza a las neuronas, lo que hace posible el disparo simultáneo de varias a la vez. Esto hace que este tipo de registro tenga gran validez estadística para identificar los tipos de canales en una conexión sináptica.

## **LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA**

Las sinapsis son las conexiones que establecen las células del sistema nervioso entre sí, o con otros tipos celulares como son los músculos o las glándulas. La comunicación que se establece puede ser rápida y precisa, o bien lenta, que incluye cadenas de señales intracelulares.

Existen dos tipos de sinapsis: las eléctricas y las químicas. En las sinapsis eléctricas, los potenciales de acción de la neurona presináptica pasan a la neurona postsináptica a través de uniones celulares comunicantes tipo "gap" o nexos. Hay continuidad citoplásmica entre ambas células, y poco retardo sináptico.

En las sinapsis de tipo químico, la comunicación entre la célula pre y postsináptica se da a través de neurotransmisores depositados en vesículas sinápticas, que son liberados al espacio sináptico e interactúan con receptores-canal localizados en la neurona postsináptica. (Kandel et al., 1991).

## **EL CALCIO Y LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR**

En 1952, Fatt y Katz registraron con electrodos intracelulares la placa neuromuscular de la rana y observaron potenciales miniatura espontáneos, con amplitud promedio  $< 1$  mV, y un tiempo medio de decaimiento de 5 msec. La frecuencia de aparición de estos potenciales sinápticos era aumentada con prostigmina, inhibidor de la acetilcolinesterasa y disminuían con curare, bloqueador de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Ach).

Fatt y Katz (1950), postularon que se trataba de potenciales subumbrales que reflejaban la liberación de pequeñas cantidades de Ach.

Desde 1894 Locke demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para la liberación del neurotransmisor en la placa neuromuscular. Fatt y Katz (1952) utilizaron concentraciones bajas de calcio en esta preparación y al estimular eléctricamente, generaron potenciales de placa provocados, los cuales presentaban amplitudes que eran múltiplos de los potenciales miniatura espontáneos. Se dice entonces que estos eventos están cuantizados o en múltiplos del potencial espontáneo.

Posteriormente, Katz y Miledi (1967a), demostraron que en preparaciones de la placa neuromuscular tratadas previamente con tetradotoxina (TTX) se obtiene la liberación del neurotransmisor al despolarizar directamente las terminales con corriente eléctrica. Utilizaron una micropipeta con  $\text{CaCl}_2$ , y observaron que al liberar el  $\text{Ca}^{2+}$  después de un estímulo eléctrico, no se generan potenciales de placa, mientras que si se libera antes del estímulo despolarizante, si .

El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la terminal presináptica con la generación del potencial de acción. La liberación del neurotransmisor se da después de alrededor de 1 mseg de haberse aplicado un pulso despolarizante, tiempo en el que el  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la terminal presináptica por varios mecanismos y da lugar a la liberación del neurotransmisor, tiempo conocido como retardo sináptico (Katz y Miledi., 1967b).

## ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CANALES DE CALCIO

La caracterización molecular de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se inició con estudios bioquímicos y moleculares del canal tipo L del músculo esquelético.

Este canal está constituido por cinco subunidades:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Campbell et al., 1988; Catterall., et al 1988) (Fig 7).

La subunidad  $\alpha 1$  funciona como sensor de voltaje y poro iónico, además es el sitio receptor para dihidropiridinas y fenilalkaminas (Hosey y Lazdunski., 1988). Esta subunidad varía en los distintos tipos de canales de calcio. Se han clonado cinco tipos de subunidad  $\alpha 1$ , de los cuales cuatro se expresan en el sistema nervioso de mamíferos (Snutch, 1990).

Las subunidades  $\alpha 2$  y  $\delta$  se encuentran unidas por puentes disulfuro, están en la cara externa de la membrana celular, con sitios de glicosilación (Fig 7).

La subunidad  $\alpha 2$ , junto con la  $\beta$ , también participan en las cinéticas de activación e inactivación de los diferentes tipos de canales de calcio (McCleskey, 1994).

Al comparar los perfiles de hidrofobicidad se tiene homología de los canales de calcio con los de sodio, por lo que pertenecen a una misma familia génica (Sather et al., 1994).

Cada subunidad está compuesta por cuatro dominios (I al IV). Cada uno tiene seis regiones transmembranales (S1 a S6), la región S4 tiene argininas o lisinas que le dan una carga positiva, por lo que se postula que forma parte del sensor de voltaje (Noda et al., 1984; Tanabe et al., 1987).

Entre las regiones S5 y S6 de cada dominio se tienen dos segmentos intercalados llamados SS1 y SS2 que forman el poro iónico del canal.

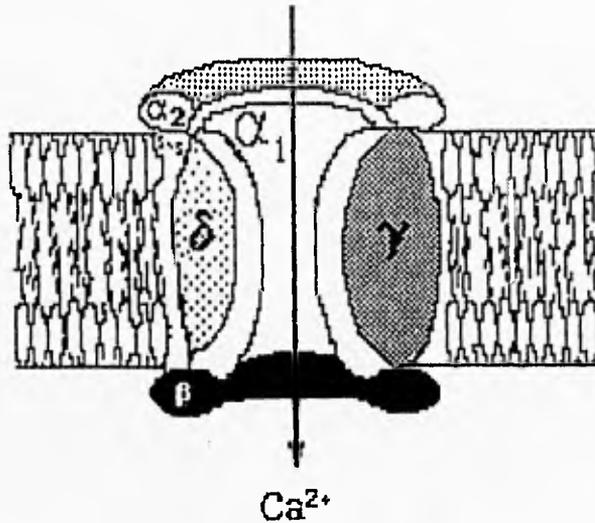


Figura 7. Estructura molecular del canal de calcio tipo L  
Hofmann et al., 1994.

## CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio se clasifican de acuerdo a:

- Voltaje de activación e inactivación
- Propiedades cinéticas
- Sensibilidad a antagonistas
- Permeabilidad iónica relativa

### **VOLTAJE DE ACTIVACION:**

Al tomar en cuenta el voltaje de activación, los canales de calcio se clasifican en: canales de bajo (LVA), y alto (HVA) voltaje de activación (Carbone y Swandulla, 1989; Tsien et al., 1988, 1991).

Este voltaje varía según las distintas células, pero en general, las corrientes que se activan a voltajes menores de -50 mV se les considera de bajo umbral, mientras que las que se activan a voltajes entre -50 y -20 mV, son de alto umbral (Carbone y Swandulla, 1989).

A los canales de bajo umbral se les conoce como canales tipo T (Tsien et al., 1988), y son sensibles al  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$  (Carbone y Swandulla, 1989). Los canales de alto umbral son bloqueados por  $Cd^{2+}$  (Swandulla et al., 1991). y se les conoce como tipo L, N, P, Q Y R; los datos indican que estos últimos canales son los que están relacionados con procesos excitación-secreción durante la transmisión sináptica (Nachshen, 1984; Suszkiw et al., 1989; Tareilus et al., 1993). Estos canales son muy permeables al  $Ba^{2+}$ , incluso en mayor proporción que al  $Ca^{2+}$  (Nelson, 1986; Hess, 1990) y son bloqueados por  $Mg^{2+}$ .

### **PROPIEDADES CINETICAS:**

De manera general, los canales de bajo umbral se inactivan rápidamente y de manera voltaje dependiente, con una constante de tiempo ( $\tau_v$ ) de 10 a 40 ms, mientras que los de alto umbral lo hacen más lentamente ( $\tau_v$  mayor de 50 ms) de manera dependiente de calcio (Carbone y Swandulla, 1989).

La inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$  se debe aparentemente a la cantidad de iones que entran a la célula o terminal presináptica. Aunque no se tienen las bases moleculares precisas, se postula que existe un "sensor" de calcio que es sensible a los cambios de concentración. Su localización aún no se determina. En canales tipo L se postula que se encuentra dentro del canal (Sherman et al., 1990; Keizer y Maki, 1992). Este mecanismo de inactivación permite evitar citotoxicidad por calcio debido a estimulación excesiva o repetitiva (Choi, 1988,1992).

La inactivación voltaje dependiente esta dada por la subunidad  $\alpha 1$  que forma el poro iónico (McCleskey, 1994) y por el tipo de subunidad  $\beta$  que presenta el canal (Ellionor et al., 1993; Sather et al., 1993).

Los estudios de cinéticas de inactivación de los canales de alto umbral se usan, por ejemplo para diferenciar los canales tipo N y L. Comparando las constantes de tiempo obtenidas en registros de fijación de voltaje de células completas y corrientes unitarias, se obtienen tiempos distintos (Fox et al., 1987; Carbone y Lux., 1987).

#### **SENSIBILIDAD A ANTAGONISTAS:**

Para que se lleven a cabo los procesos de excitación-secreción de neurotransmisor es necesaria la entrada de  $Ca^{2+}$  por canales de calcio dependientes de voltaje que se encuentran en la terminal presináptica.

Los canales de  $Ca^{2+}$  presentan sensibilidad a distintos bloqueadores selectivos que nos permiten distinguir entre los distintos tipos.

Actualmente, con base en esta sensibilidad a los antagonistas se tienen identificados seis tipos de canales de calcio, los T, L, N, P, Q, R (Tarcilus y Breer , 1995), de los cuales existen distintas isoformas dadas por múltiples genes que codifican las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$  (Snutch et al ., 1990; Hullin et al ., 1992).

Por caracterización farmacológica, se sabe que la  $\omega$ -conotoxina GVIA bloquea canales de calcio tipo N. Este péptido de 27 aminoácidos purificado del gasterópodo marino *Conus geographus* (Olivera et al., 1984; Fox et al., 1987a, b; Sher y Clementi, 1991; Tsien et al., 1991) bloquea la liberación presináptica de la placa neuromuscular de la rana (Kerr y Yoshikami ,1984).

Los canales de calcio tipo L son bloqueados por dihidropiridinas, como la nifedipina, la nimodipina (Fox et al 1987a, b) y por la toxina calciseptina (Weille et al., 1991) tanto en células neuronales (Fox et al 1987a, b) como en canales expresados a partir de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) (Williams et al., 1992).

En las neuronas cerebelares de Purkinje de mamíferos, se encontró corrientes de de calcio de alto umbral, que no eran bloqueados por dihidropiridinas, ni por la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Regan, 1991; Regan et al., 1991), se propuso que existía un canal de calcio distinto a los ya descritos, al cual se le llamo canal de calcio tipo P, por estar en las neuronas de Purkinje (Llinas et al., 1989). Los canales tipo P inicialmente fueron caracterizados por su sensibilidad a las poliaminas y la FTX (fulltoxin), extraídas de veneno de arácnidos (Llinas et al., 1989b; Uchitel y Protti, 1992).

Posteriormente se aisló un péptido de alto peso molecular, la  $\omega$ -agatoxina IVA, purificada del veneno del arácnido *Agelenopsis aperta*, la cuál se encontró que bloqueaba corrientes en células de Purkinje, insensibles a las toxinas anteriores (Mintz et al., 1992 ).

Hay evidencias de otra clase de corrientes de alto umbral que son insensibles a todos los tipos anteriores de toxinas (Takahashi y Momiyama, 1993; Wheeler et al., 1994 ), a los que se les ha llamado corrientes tipo Q. La  $\omega$ -conotoxina MVIIC, aislada del veneno de *Conus magus* bloquea estas corrientes (Randall et al., 1993; Sather et al., 1993). Se propone que bloquea las corrientes Ry Q (Tareilus y Breer, 1995).

Sin embargo, existe gran controversia al respecto se reporta que la  $\omega$ -conotoxina MVIIC inhibe canales de calcio tipo N (Randall et al., 1993; Swartz et al., 1993; Wu y Saggau, 1995) y canales de calcio sensibles a dihidropiridinas (Monje et al., 1993), aunque por estudios de autoradiografía, se ha reportado que la [<sup>125</sup>I]  $\omega$ -conotoxina MVIIC presenta afinidad distinta a los canales de calcio tipo N (Filloux et al., 1994).

TABLA I

CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES DE CALCIO SENSIBLES A VOLTAJE

	T	L	N	P	Q	R
Voltaje de activación	<-50 <sup>a</sup>	-45, -20 <sup>uu</sup>	-30,-20 <sup>a</sup>	-30,-20 <sup>uu</sup>	<-20 <sup>a</sup>	<-20 <sup>a</sup>
Inactivación dependiente de calcio	- <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>c</sup>	?	?
Efecto de cinasas	?	+ <sup>d</sup>	+ <sup>e</sup>	?	?+ <sup>f</sup>	?
Modulación por proteínas G	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>	+? <sup>f,h</sup>	+?
Eficiencia en el bloqueo Cd <sup>2+</sup> -Ni <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup> •Cd <sup>2+</sup> <sup>l</sup>	Cd <sup>2+</sup> •Ni <sup>2+</sup> <sup>ii</sup>	Cd <sup>2+</sup> •Ni <sup>2+</sup> <sup>ii</sup>	Cd <sup>2+</sup> •Ni <sup>2+</sup> <sup>ii</sup>	Cd <sup>2+</sup> •Ni <sup>2+</sup> <sup>ii</sup>	?
Sensibilidad a dihidropiridinas	- <sup>i</sup>	+ <sup>i</sup>	- <sup>i</sup>	- <sup>k</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>
Bloqueo por ω-CTX-GVIA	- <sup>j</sup>	+ <sup>i</sup> - <sup>j</sup>	+ <sup>ll</sup>	- <sup>l</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>
Bloqueo por ω-CTX-MVVIC	-? <sup>l</sup>	- <sup>l</sup>	- <sup>l</sup>	- <sup>l</sup>	- <sup>ll</sup>	+ <sup>f</sup>
Bloqueo por ω-Aga-IVA	- <sup>m</sup>	- <sup>m</sup>	- <sup>m</sup>	+ <sup>m</sup>	+ <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>
Tipo de subunidad α I	α <sub>Ic</sub> <sup>o</sup>	α <sub>Ic</sub> <sup>o</sup> α <sub>Ic</sub> <sup>p</sup> α <sub>Id</sub> <sup>q</sup>	α <sub>Ih</sub> <sup>r</sup>	α <sub>IA</sub> ? <sup>t</sup>	α <sub>IA</sub> ? <sup>t</sup>	α <sub>IE</sub> ? <sup>u</sup>

Referencias: (a) Carbone y Swandulla (1989); (b) Imredy e Yue (1992); (c) Tarcilus et al. (1994a); (d) Trautwein y Hescheler (1990); (e) Mintz y Bean (1993); (f) Wheeler et al (1994); (g) Scott et al (1991); (h) Trautwein y Hescheler (1990); (i) Tsien et al (1987); (j) Hess (1990); (k) Tsien et al (1991); (l) Hillyard et al (1992); (m) Mintz et al (1992); (n) Soong et al (1993) (o) Mikami et al (1989); (p) Koch et al (1990); (q) Williams et al (1992); (r) Dubel et al (1992) (s) Starr et al (1991); (t) Ellinor et al (1993); (u) Bargas et al (1994)

## REGULACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO

Se postula que la actividad de los canales de calcio está regulada por proteínas G (Hescheler et al., 1987; Ewald et al., 1988). La activación de estas proteínas por neurotransmisores como Ach, GABA, noradrenalina y serotonina generalmente inhibe canales de calcio, en muchos casos de tipo N (Lipscombe y Tsien, 1987; Wanke et al., 1987; Gross y McDonald, 1987; Ewald et al., 1988).

En lo que se refiere a la regulación por segundos mensajeros, existen fuertes evidencias de activación de proteínas cinasas C (PKC) en la modulación de canales de calcio. La aplicación de activadores de esta cinasa pueden aumentar (Gollasch et al., 1993; Swartz et al., 1993) o inhibir (Rane et al., 1989; Hockberger et al., 1989; Keyser y Alger, 1990) las corrientes de calcio. El sustrato molecular de la PKC no ha sido identificado, podría ser un subgrupo de enzimas (Thompson et al., 1993; Gollasch et al., 1993), o algún componente del canal de calcio (Gollasch et al., 1993; Ahljanian et al., 1991; Hell et al., 1994). La activación de esta vía es suficiente a veces para explicar la regulación de la transmisión sináptica (Swartz et al., 1993). En las entradas corticoestriatales se ha observado que la PKC, estimulada por esteroides de forbol, aumenta la respuesta sináptica antes y después de la aplicación de  $\omega$ -conotoxina, bloqueador específico del canal de calcio tipo N (Lovinger et al., 1994).

La regulación por proteína cinasa A (PKA) dependiente de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) es muy importante en canales de  $Ca^{2+}$  de células cardíacas (Trautwein y Hescheler, 1990). En sistema nervioso central, se ha demostrado la presencia de

regulación de los canales tipo L (Surmeier et al., 1995), precisamente en las neuronas espinosas medianas del neocstriado.

La proteína cinasa II dependiente de calcio calmodulina se encuentra abundantemente en las terminales presinápticas , pero aún no se le ha encontrado función regulatoria en los canales de calcio dependientes de voltaje (Ouimet et al., 1984; Benfenati et al., 1992)

En lo que se refiere a la regulación por fosfoinositidos, se ha sugerido la presencia de receptores a inositol trifosfato ( $IP_3$ ) en terminales nerviosas (Peng et al., 1991; Finch et al., 1991). En sinapsomas se ha observado elevación de los niveles de  $IP_3$  durante despolarizaciones, aparentemente por activación de la fosfolipasa C (PLC) (Audigier et al., 1988; Chandler y Crewx, 1990; Finch et al., 1992).

### **OBJETIVO GENERAL**

La liberación de glutamato es necesaria para la activación de las neuronas espinosas medianas gabaérgicas, por lo que el objetivo de este trabajo es identificar farmacológicamente, por medio de antagonistas específicos, los canales de calcio que participan en la liberación de glutamato de las aferentes glutamatérgicas al neocórtico.

## METODOS

### OBTENCION DE LAS REBANADAS

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar de 100 a 120 gr. de peso, a las que se anestesió y decapitó, para remover el cerebro que se colocó en solución salina fría (3 a 4°C). se trasladó a un vibratomo, y se obtuvieron rebanadas sagitales de 400  $\mu\text{m}$  de espesor, las cuáles incluían al neocórtex, la corteza y el cuerpo calloso. Se oxigenaron con una mezcla de 95% $\text{O}_2$ -5% $\text{CO}_2$  durante una hora a temperatura ambiente antes de trasladarlas a la cámara de registro. Dentro de ésta, se les mantuvo con un flujo constante de 2ml/min de solución salina y con temperatura de 34°C.

La solución salina tuvo la siguiente composición (mM): 125 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucosa.

### OBTENCIÓN DE LOS REGISTROS

#### EXTRACELULAR

Los registros extracelulares se obtuvieron con estimulación de las fibras aferentes al neocórtex, con un electrodo bipolar concéntrico de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, colocado en el cuerpo calloso.

La estimulación fue constante de 0.4 ms de duración y 0.2 pulsos por segundo (pps) de frecuencia y 4 V de amplitud (Grass S48). Estos estímulos se trasladaron a la unidad aisladora de estímulos (Digitimer Ltd., modelo DS2A) en donde se reguló la amplitud

de los mismos. Se utilizaron electrodos de registro de 2-4 M $\Omega$  de resistencia con NaCl 0.9% como conductor (Fig 8).

Para observar los efectos de los bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup> sobre el potencial de campo de origen glutamatérgico, se agregó previamente bicuculina 10  $\mu$ M para bloquear el componente gabaérgico. El potencial de prueba registrado se mantuvo a la mitad de la máxima amplitud. Los registros fueron amplificadas por un amplificador (Grass P15), digitalizados por un Neurocorder DR-384 y grabados en cintas de videocassete VHS.

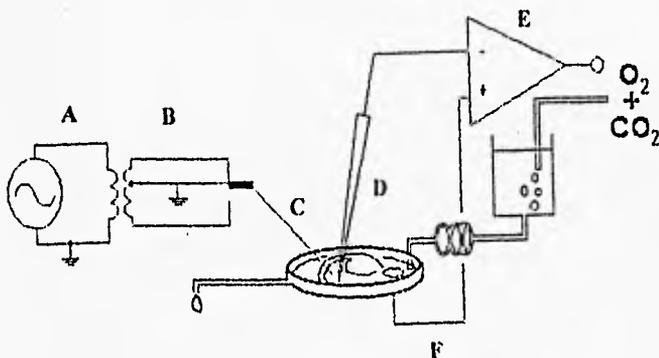


Figura 8. Diagrama que muestra el diseño experimental para el registro de potenciales de campo. A) Estimulador. B) Unidad aisladora de estímulos. C) Electrodo bipolar concéntrico de estimulación. D) Electrodo de registro. E) Amplificador. F) Cámara de registro a 37°C y con flujo constante de solución salina.

## **INTRACELULAR**

Se obtuvieron con electrodos de vidrio de 80 a 120 MW de resistencia . La estimulación fue igual a la descrita anteriormente.

El potencial de membrana se mantuvo a -80 mV , voltaje al cual se provocó los potenciales sinápticos en presencia de bicuculina 10 mM. Se tomó el promedio de 5 a 6 potenciales y se midió la amplitud inicial y final, después de agregar las toxinas específicas y observar sus efectos en el potencial sináptico.

## **PULSOS PAREADOS**

Se define la facilitación sináptica como un incremento en el tamaño del segundo potencial como consecuencia de la primera respuesta. Esto se debe a que al calcio que quedó durante la primera estimulación se suma a el que entra por el segundo pulso, lo que da lugar a un aumento de la liberación de neurotransmisor durante el segundo estímulo (Junge, 1992; Andersen, 1960; Lomo 1971; Alger y Teyler, 1976; Dunwiddie y Lynch, 1978; Buckle y Haas 1982).

Cuando se utilizan concentraciones pequeñas de calcio (1 mM), se puede observar mejor la facilitación sináptica.

Sin embargo, cuando se utilizan concentraciones altas de  $Ca^{2+}$  externo (10 mM), no se observa facilitación, debido a que aumentó tanto la entrada de calcio a las terminales sinápticas durante el primer estímulo, que se ocasiona un agotamiento en el reservorio de vesículas sinápticas que se liberan.

Por lo tanto, la proporción entre el segundo y el primer potencial sináptico es mayor en condiciones de bajo calcio.

De manera similar, los antagonistas que inhiben la liberación del neurotransmisor al bloquear directa o indirectamente la entrada de calcio, provocan facilitación como si se tuvieran condiciones similares a las de bajo calcio. Por eso, la facilitación sináptica se utiliza para saber si un fármaco actúa presinápticamente.

Si el efecto sobre la respuesta sináptica se debe a un cambio postsináptico, la proporción entre el segundo y el primer potencial no cambia. (Dunwiddie y Hass, 1985).

Para observar la facilitación sináptica, las rebanadas de cerebro se estimularon con pares de choques con un electrodo bipolar colocado en el cuerpo calloso a estimulación constante de 0.2 pulsos por segundo. El intervalo entre los potenciales pareados fue de 50 ms de duración.

## **RESULTADOS**

### **CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES SINÁPTICOS**

Para corroborar el origen sináptico del componente  $N_2$ , se colocaron las rebanadas en una solución con 6.0 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, y se observa un bloqueo total del componente  $N_2$ , mientras que el componente  $N_1$  permaneció intacto (Fig 9). Este efecto es reversible (Malenka y Kocsis, 1988).

La figura 10 sugiere que la transmisión sináptica es dependiente de la entrada de calcio a través de canales de alto umbral (Nachshen, 1984; Suszkiw et al; 1989; Tarcilus et al 1993) pues esta es bloqueada por el Cd<sup>2+</sup> (Swandulla et al; 1991). Como se muestra en la Figura 10, 50  $\mu$ M de Cd<sup>2+</sup> bloquea la transmisión en un 80%, lo que indica que la transmisión sináptica está dada por canales de alto umbral de activación. El efecto es reversible.

### **EFFECTO DE ANTAGONISTAS GLUTAMATERGICOS Y GABAERGICOS**

#### **SOBRE EL POTENCIAL SINAPTICO $N_1$**

Las sinapsis rápidas en el neocórtex de ratas adultas están dadas por receptores -canal a glutamato y GABA (Wilson, 1990; Seabrock et al., 1991; Flores Hernández et al., 1994).

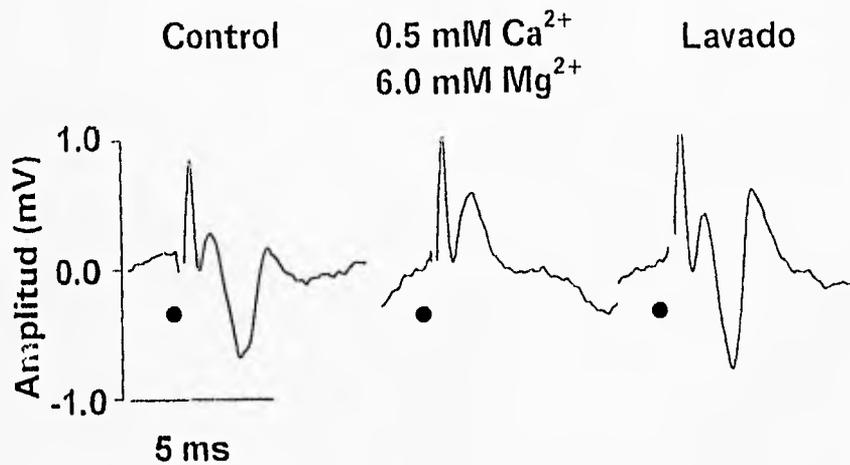


Figura 9.

Identificación del componente sináptico (ortodrómico) del potencial de campo neocortical con solución de baja concentración de calcio; control (izquierda), durante (centro) la aplicación de solución salina con 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 6 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Note la abolición del componente sináptico  $\text{N}_2$ .

El efecto de la solución con bajo  $\text{Ca}^{2+}$  es reversible (derecha).

● Momento en que se aplicó el estímulo.

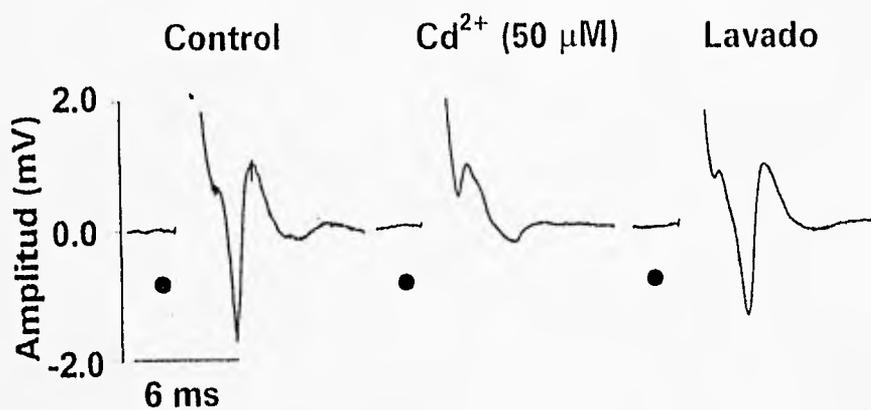


Figura 10.

Acción del  $\text{Cd}^{2+}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) sobre el componente ortodrómico  $\text{N}_1$  del potencial de campo neocortical. La amplitud del componente  $\text{N}_1$  cae un 80% a los 5 minutos de aplicación (centro). El bloqueo es reversible (derecha) con la re aplicación de solución salina sin cadmio (derecha).

La actividad glutamatergica en el neocortico es importante en la transmisi3n sin4ptica de las c3lulas del neocortico. Mediante registro intracelular, se han registrado potenciales sin4pticos despolarizantes que son bloqueados por 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), antagonista del receptor tipo AMPA en un 90% y por 4cido D(-)-2-amino-fosfonoval3rico (APV), antagonista del receptor tipo NMDA en un 10% (Jiang y North, 1991). En potenciales de campo, este neurotransmisor media la actividad ortodr3mica del componente N<sub>2</sub> (Lovinger et al., 1993).

La actividad sin4ptica inhibitoria es mediada por el GABA, sobre todo del receptor tipo GABA<sub>A</sub>. Este neurotransmisor es sintetizado por las neuronas espinosas medianas, que representan el 95% de la poblaci3n total de neuronas, (Chang et al., 1982; Wilson, 1990) y por interneuronas medianas sin espinas (Kita, 1993; Kawaguchi et al., 1993, 1994). Para estudiar la actividad glutamatergica se bloque3 la gaba3rgica con 10 μM de bicuculina, bloqueador especifico de este receptor. Como se observa en la Figura 11, despu3s de la aplicaci3n de bicuculina se di3 un aumento en la amplitud del componente N<sub>2</sub>. En presencia de bicuculina, la inhibici3n de N<sub>2</sub> por el CNQX (25 μM) fue del 80±7.7% ( n=3).

#### **EFEECTO DEL CADMIO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATERGICA**

En presencia de 10μM de bicuculina, se observ3 la actividad glutamatergica de las aferentes al neocortico.

La figura 12A muestra el efecto de la adici3n de bicuculina sobre el potencial de campo provocado por estimulaci3n m4xima en el cuerpo calloso. La bicuculina indujo la

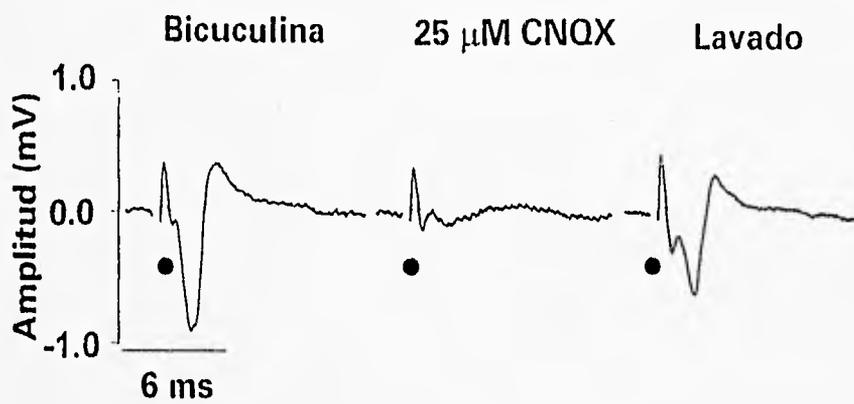


Figura 11.

Acción del CNQX. En presencia de bicuculina (10  $\mu$ M), la inhibición provocada por CNQX (25  $\mu$ M) fue del 86%.

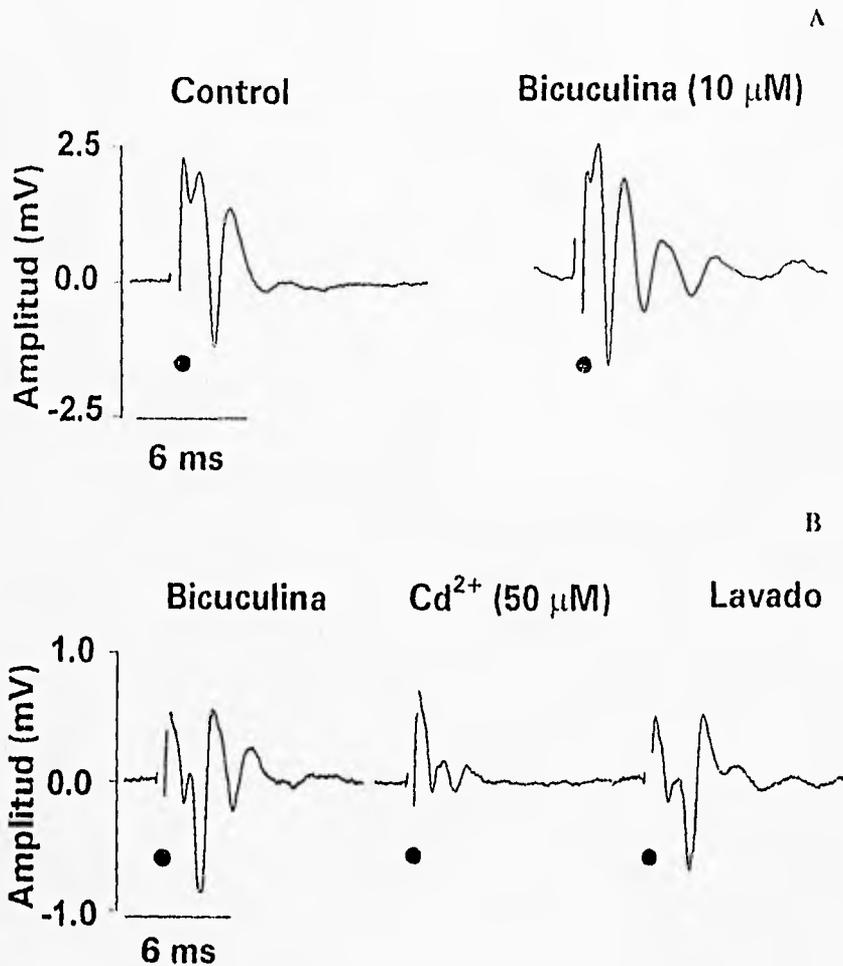


Figura 12

A) Acción de la bicuculina (10  $\mu\text{M}$ ) sobre un potencial provocado con estimulación máxima. El bloqueador del receptor gabaérgico tipo A se aplicó a la máxima estimulación (4V) para provocar el potencial  $N_7$ . Observe la aparición de nuevos componentes poblacionales polispiga. B) En presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ), dichos componentes son eliminados. El componente  $N_7$  se bloquea en un 76%.

aparición de nuevos componentes ortodróxicos poblacionales, lo que indica el disparo repetitivo de varias neuronas.

Cuando en estas condiciones se agrega  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ), en otra rebanada (Fig 12B) se observa un bloqueo del  $82.3 \pm 5.5\%$  ( $n=3$ ) del componente poblacional  $\text{N}_2$ . También se eliminan los potenciales ortodróxicos poblacionales originados por la aplicación de la bicuculina. El efecto del cadmio fue reversible.

El estudio de los bloqueadores específicos de los canales de calcio se centró en el componente  $\text{N}_2$ . La pregunta es: ¿qué canal de  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la actividad de las aferentes glutamatérgicas?

#### **ACCION DE LAS TOXINAS BLOQUEADORAS DE CANALES DE $\text{Ca}^{2+}$ TIPO N Y P SOBRE LA ACTIVIDAD SINÁPTICA DE LAS AFERENTES GLUTAMATERGICAS NEOESTRIATALES**

La  $\omega$ -agatoxina IVA es un péptido de 48 aminoácidos purificado del arácnido *Agalenopsis aperta*. Es bloqueador específico de canales de calcio tipo P, inicialmente caracterizado en neuronas de Purkinje del cerebelo (Llinás et al., 1989) y en neuronas sensoriales (Mintz et al., 1992). En sinaptosomas estriatales de rata se reporta una dosis de 30 nM para la  $\omega$ -agatoxina IVA (Turner et al., 1993) al igual que para corrientes de calcio de las neuronas de Purkinje (Randall et al., 1993). Se ha reportado un bloqueo específico de corriente de calcio tipo P con concentraciones de 100 a 200 nM de  $\omega$ -agatoxina IVA (Mintz et al., 1992).

Al estimular las fibras cortico-estriales a la máxima intensidad, (Fig. 13) la presencia de  $\omega$ -agatoxina VIA (200 nM) produce una inhibición del  $14.5 \pm 6.3\%$  ( $n=2$ ). La porción no bloqueada fue abolida con  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ .

La  $\omega$ -conotoxina GVIA es un péptido de 27 aminoácidos, purificado del veneno del gasterópodo marino *Conus geographus*. Es un potente bloqueador irreversible de canales de calcio tipo N (Fox et al., 1987a,b; Sher y Clementi, 1991; Tsien et al., 1991).

La concentración necesaria y saturante de  $\omega$ -conotoxina GVIA para bloquear canales de calcio tipo N es de  $1 \mu\text{M}$  (Regan et al., 1991a,b; Luebke et al., 1993; Turner et al., 1993; Lovinger et al., 1994). No hay gran modificación de la respuesta si se utilizan concentraciones de  $0.5$  a  $3 \mu\text{M}$  (Wheeler et al., 1994; Mintz et al., 1995).

En la figura 14 se observa el efecto de este bloqueador de canales de calcio tipo N a una concentración de  $2 \mu\text{M}$  sobre el potencial poblacional cuando se estimuló el cuerpo calloso a la máxima intensidad. A los 10 minutos de aplicación de la bicuculina, aparecieron dos nuevos componentes poblacionales, los cuáles desaparecieron casi en su totalidad a los 6 minutos de la aplicación de la toxina, mientras que el componente  $N_2$  sólo mostró una reducción del  $23.5 \pm 3.5$  ( $n=2$ ). Se esperó 20 minutos, tiempo durante el cual no hubo cambios en el mismo.

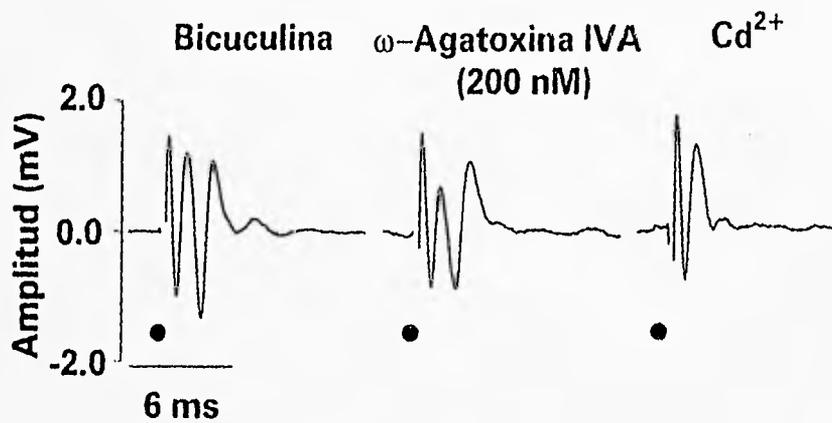


Figura 13. Inhibición de la transmisión sináptica neostriatal por la  $\omega$ -Agatoxina IVA (200nM). El registro se realizó con la máxima intensidad de voltaje. Se observó una inhibición del 20% con la toxina. Con la adición posterior de  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ), se eliminó totalmente el componente ortodrómico.

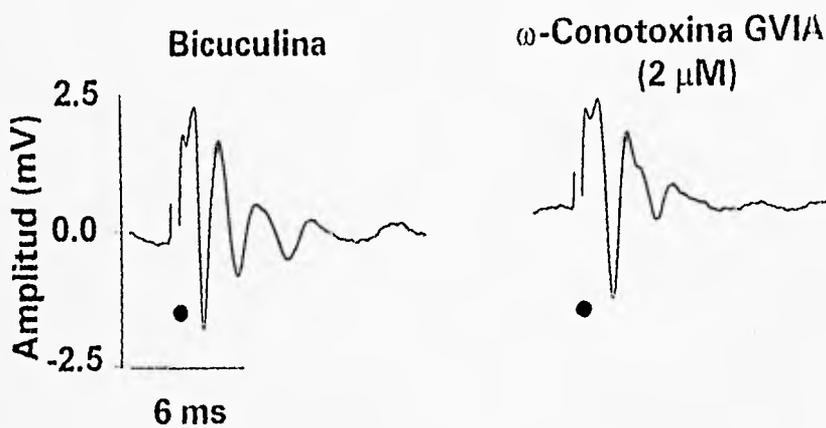


Figura 14.

Acción de la  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $2 \mu\text{M}$ ), sobre el potencial ortodrómico provocado con estimulación máxima en presencia de bicuculina ( $10 \mu\text{M}$ ). El bloqueador de canales de calcio tipo N lo reduce en un 21%. El disparo repetitivo se abole casi por completo.

## EFFECTO DE LA $\omega$ -CONOTOXINA MVIIC EN EL POTENCIAL SINAPTICO

### POBLACIONAL $N_2$

Esta toxina fue aislada del veneno de *Conus magus*. Se ha propuesto que ésta inhibe canales de calcio tipo N (Randall et al., 1993; Swartz et al., 1993; Wu y Saggau, 1995), otros reportes sugieren que afecta corrientes de calcio de alto umbral resistentes a dihidropiridinas,  $\omega$ -conotoxina GVIA, y  $\omega$ -agatoxina (Monje et al., 1993), a la que se le llama corriente Q (Randall et al., 1993; Sather et al., 1993).

En la figura 15C (E) se muestra el efecto de la  $\omega$ -conotoxina MVIIC (500 nM). Produce una disminución del 50% en el componente ortodrómico poblacional. En el potencial sináptico intracelular provocado, se observa un bloqueo del 39% (15C) (I).

## EFFECTO DE LA CALCISEPTINA EN EL POTENCIAL SINAPTICO $N_2$

Los canales de calcio tipo L son bloqueados selectivamente por las dihidropiridinas como la nitrendipina y la nifedipina (Fox et al., 1987a,b).

Se ha reportado que la liberación de neurotransmisores en neuronas periféricas (Perney et al., 1986), y en el sistema nervioso central no se modifica en presencia de estos compuestos, lo que sugiere la escasa participación de estos canales en la transmisión sináptica (Hirning et al., 1988; Luebke et al., 1993; Takahashi y Moniyama, 1993; Whittington y Little, 1991).

Sin embargo, aún existe controversia al respecto, pues el mecanismo de bloqueo es dependiente del voltaje, de forma que podría no haber efecto (falsos negativos) cuando

no se está en condiciones de fijación de voltaje. Por lo anterior, en este trabajo se utilizó calciseptina, que es un péptido purificado del veneno del ofidio *Dendroaspis polylepis* *polylepis*, bloqueador del canal de calcio tipo L.

Los resultados muestran una inhibición del 16% en la amplitud del potencial  $N_2$  a los 18 minutos de su aplicación (Fig 15D)(E), sin mostrar efecto alguno en el potencial sináptico provocado (15D) (I).

Esta es la toxina que mostró un menor efecto sobre la transmisión sináptica.

#### **EFFECTOS ADITIVOS DE LOS BLOQUEADORES ESPECIFICOS DE CANALES DE CALCIO TIPO P Y N**

Para observar los efectos de las toxinas en la amplitud de los potenciales sinápticos, estos se registraron a la mitad de la máxima estimulación.

En la figura 16A se muestra el efecto de la  $\omega$ -agatoxina IVA 200 nM, se observó un bloqueo del 54% del potencial sináptico  $N_2$ . El efecto del péptido fue irreversible. Posteriormente, se agregó  $\omega$ -conotoxina GVIA (1  $\mu$ M), y se observó una inhibición adicional del 31% en el potencial sináptico que quedó. Ambas toxinas juntas bloquean el 85% del potencial sináptico poblacional. Efectos similares se observan cuando se invierte el orden de las toxinas (16B).

En los sinápticos provocados, la  $\omega$ -agatoxina IVA (200 nM) provocó una inhibición del  $34.5 \pm 0.7$  % (n= 2) (15A) (I). En otra rebanada, la  $\omega$ -conotoxina GVIA (1  $\mu$ M) provocó un 37% de inhibición.(15B) (I).

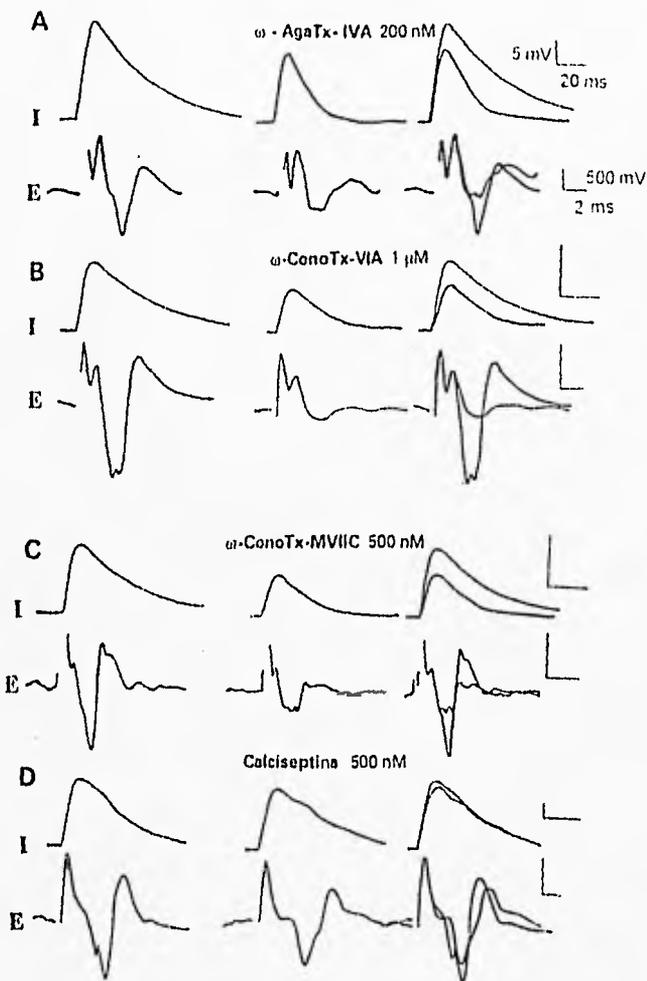


Figura 15.

Efecto de las toxinas antagonistas de los canales de calcio sobre los potenciales sinápticos intracelulares (I) y los potenciales de campo (E), a estimulación semimáxima. A) Efecto de la  $\omega$ -agatoxina IVA (200 nM) en ambos registros. B) Efecto de la  $\omega$ -conotoxina GVIA (1  $\mu$ M). C) Efecto de la  $\omega$ -conotoxina MVIIC (500 nM). D) La calciseptina (500 nM) no tuvo gran efecto sobre la transmisión sináptica.

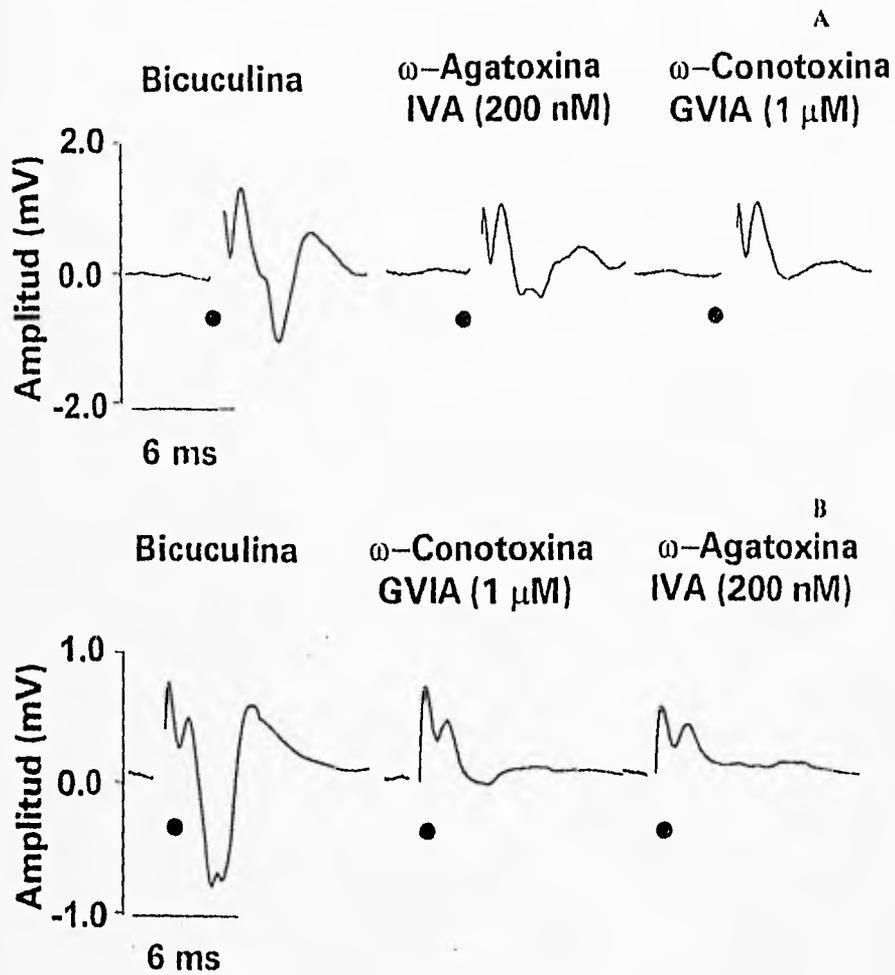


Figura 16.

Efecto aditivo de la  $\omega$ -agatoxina IVA y la  $\omega$ -conotoxina GVIA sobre el potencial de campo provocado con estimulación semimáxima.

A) Cuando se agregó  $\omega$ -agatoxina IVA (200 nM) se observó inhibición, que aumentó con la adición de  $\omega$ -conotoxina (1  $\mu$ M) hasta abolir la respuesta sináptica.

B) Invertiendo el orden de aplicación de las toxinas, se obtuvo el mismo resultado.

## EFECTOS EN LA FACILITACION SINAPTICA

Con el protocolo de pulsos pareados de 50 ms de duración entre pulso y pulso y 0.1 PPS de frecuencia, se observa un aumento en la amplitud del segundo potencial ortodrómico en presencia de bicuculina. La relación  $S2/S1=1.82$ . Después de la aplicación de  $\omega$ -agatoxina IVA la facilitación fue mayor, del 207%, dando proporción  $S2/S1= 3.07$  (Fig 17).

Esto sugiere que la  $\omega$ -agatoxina IVA actúa impidiendo la entrada de calcio y la salida del neurotransmisor de las terminales sinápticas.

Por otro lado, con la calciseptina no se observó un aumento en la facilitación con pulsos pareados (Fig 18), con relación  $S2/S1= 1.29$  con respecto a la obtenida con la aplicación de bicuculina de 1.27.

**TABLA II**

### **PORCENTAJE DE BLOQUEO DE LAS TOXINAS SOBRE LOS POTENCIALES SINAPTICOS PROVOCADOS Y LOS POTENCIALES ORTODROMICOS POBLACIONALES**

TOXINA	EXTRACELULAR	INTRACELULAR
$\omega$ -agatoxina IVA	54	34
$\omega$ -conotoxina GVIA	63	37
$\omega$ -conotoxina MVIIIC	50	39
calciseptina	16	sin efecto

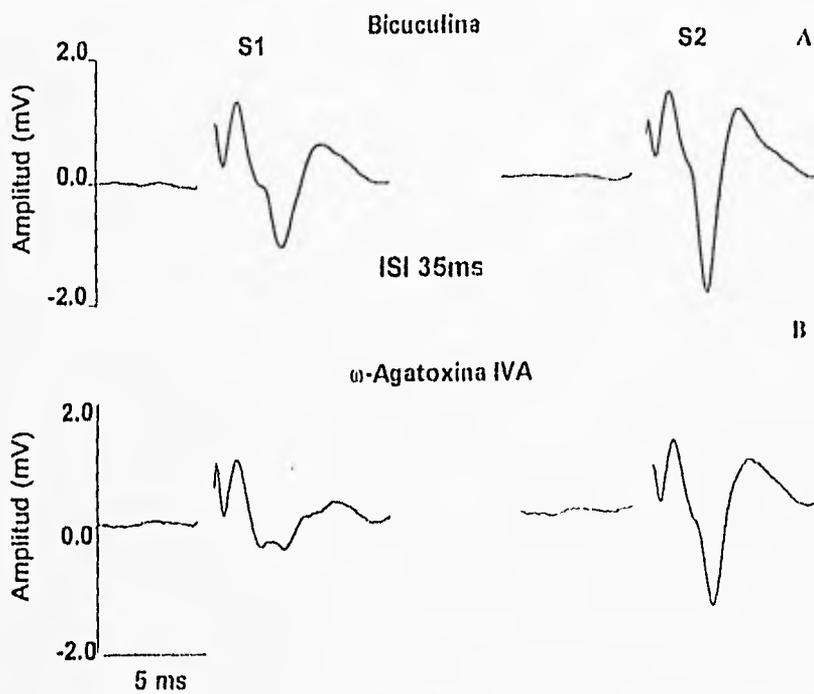


Figura 17

Acción de la  $\omega$ -agatoxina IVA sobre la facilitación sináptica.

Pulsos pareados con intensidad semimáxima separados por un intervalo de 50 mseg en presencia de bicuculina (10  $\mu$ M). La facilitación de la segunda respuesta en condiciones control es de 82% (A), y con  $\omega$ -agatoxina IVA es 207% (B).

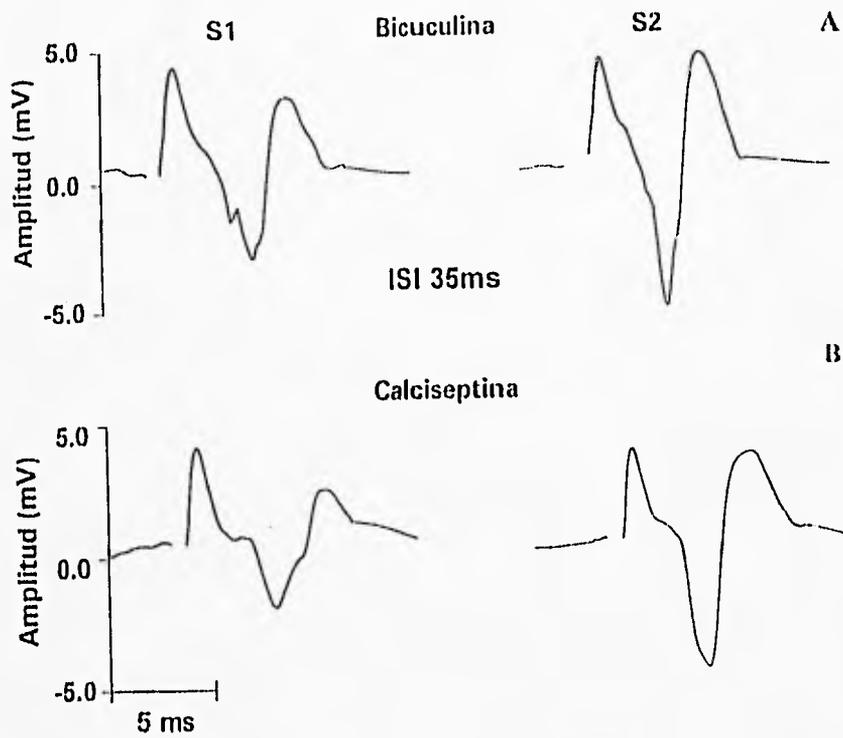


Figura 18.

Acción de la calciseptina sobre la facilitación sináptica.

Pares de estímulos separados por un intervalo de 50 mseg. Se muestra facilitación de 29% en la segunda respuesta en condiciones control (A). Esta facilitación no cambia significativamente en presencia de la calciseptina 500 nM (B).

## DISCUSIÓN

### LA ACTIVIDAD SINÁPTICA DE LAS AFERENTES EXCITATORIAS ES MEDIADA POR GLUTAMATO

En el neocóstriado se observan dos componentes poblacionales en un registro de potencial de campo cuando se estimulan las fibras cortico-estriatales. El componente  $N_1$  que representa la actividad antidrómica que resulta de la estimulación eléctrica de los axones y el componente  $N_2$  que representa la suma de los potenciales sinápticos y de acción de las neuronas activadas sinápticamente por las aferentes (Cordingley e Weight, 1986; Lovinger, et al., 1992).

La actividad glutamatérgica en el neocóstriado proviene de la corteza cerebral (Mori et al., 1994; Wilson, 1994) y del tálamo (Royce, 1982, 1987; Royce y Bolem, 1984). Estudios con estimulación de campo, han reportado una respuesta ortodrómica mediada por glutamato (Lovinger, et al., 1993). Además se han registrado intracelularmente potenciales sinápticos excitatorios en el neocóstriado, que son bloqueados por antagonistas del receptor AMPA (CNQX) en un 90% y por antagonistas del receptor tipo NMDA (APV) en un 10% (Jiang y North, 1991).

Nuestros resultados muestran una disminución de alrededor de 80% en la amplitud del potencial sináptico  $N_2$  en presencia CNQX, lo que corrobora que la transmisión en estas sinápsis es mediada principalmente por la activación de receptores tipo AMPA glutamatérgicos (Cherubini, et al., 1988; Herrling, 1985; Lovinger, et al., 1992).

Las neuronas espinosas medianas representan el 95% de la población neuronal total en este núcleo y son GABAérgicas (Chang, et al., 1982; Wilson, 1990), por consiguiente las sinapsis inhibitorias son principalmente intrínsecas.

Con el objetivo de aislar la actividad glutamatérgica en el neocórtex, se agregó bicuculina (10  $\mu$ M), y no se observaron cambios significativos en la inhibición del potencial  $N_2$  causada por CNQX.

#### **ACCIONES DE LAS TOXINAS BLOQUEADORAS DE LOS CANALES DE $Ca^{2+}$ SOBRE EL POTENCIAL ORTODROMICO**

Diversas evidencias indican que la transmisión sináptica en anfibios (Kerr y Yoshikami, 1984), reptiles (Lindgren y Moore, 1989) y aves (Rivier et al., 1987; Venema et al., 1992) es mediada por la activación de canales de calcio tipo N. Por otro lado, se ha observado en el hipocampo (Kamiya et al., 1988; Dutar et al., 1989; Horne y Kemp, 1991) y en el núcleo accumbens (Kamiya et al., 1988; Dutar et al., 1989; Horne y Kemp, 1991) de la rata, una disminución, aunque no total, de la transmisión sináptica en presencia  $\omega$ -conotoxina GVIA, bloqueador irreversible de canales de calcio tipo N.

En sinaptosomas corticales y estriatales se ha observado que la  $\omega$ -conotoxina no tiene efecto en la liberación de neurotransmisor (Turner et al., 1992).

En esta tesis se reporta una disminución del 63% en el potencial ortodrómico  $N_2$ , cuando se estimularon las fibras cortico-estriatales con intensidad semimáxima en presencia de  $\omega$ -conotoxina GVIA. El bloqueo se redujo  $23.5 \pm 3.5\%$  ( $n=2$ ) cuando la intensidad de estimulación fue la máxima. Esto quiere decir que la magnitud del bloqueo depende de la intensidad de estimulación.

Se ha encontrado un bloqueo similar en las terminales cortico-estriatales por Lovinger, et al. (1994), en las sinápsis glutamatérgicas de la región CA1 del hipocampo (Wheeler, et al., 1994; Takahashi y Momiyama; 1993), en las neuronas de Purkinje del cerebelo (Mintz, et al., 1995) y en las motoneuronas de la espina dorsal (Takahashi y Momiyama; 1993).

Por otro lado, en el núcleo accumbens se encontró que la  $\omega$ -conotoxina causó una reducción en el potencial sináptico poblacional del 76%; mientras que en el EPSP intracelular provoca una disminución del 64%. En el hipocampo, esta toxina provocó solo un 31% de inhibición cuando se estimularon las colaterales de Schaffer (Horne y Kemp; 1991). Sin embargo, en este mismo núcleo la toxina produjo una inhibición en el potencial excitatorio posináptico (EPSP) y la corriente excitatoria posináptica (EPSC) del 73% y 80% respectivamente (Luebke et al., 1993).

En los mamíferos se encontró que la transmisión sináptica es inhibida parcialmente por la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Reynolds et al., 1986; Lundy et al., 1991). En la unión neuromuscular de ratón no tuvo efecto alguno (Kerr y Yoshikami, 1984; Uchitel

et al., 1992). Por estas razones se sugiere que existe un canal de calcio diferente en las terminales sinápticas del sistema nervioso de los mamíferos.

Algunos reportes previos indican que en sinaptosomas corticales y estriatales no hay inhibición por  $\omega$ -conotoxina, pero sí por  $\omega$ -agatoxina IVA de un 80% (Turner et al., 1992, 1993).

Con el objetivo de identificar si el canal P podría mediar la transmisión sináptica en las aferentes cortico-estriatales, se estudió el efecto de 200 nM de  $\omega$ -agatoxina IVA sobre el potencial de campo y los potenciales sinápticos provocados. Se encontró disminución en la amplitud del potencial sináptico  $N_2$  del 20% y 54% cuando se estimuló al máximo (Fig 13) y a la mitad (Fig 15 A) (E) de la intensidad respectivamente.

En contraste, Lovinger et al, (1994) reportan en estas mismas sinapsis cortico-estriatales una inhibición del 10% sobre el potencial de campo cuando se aplicó la misma dosis de  $\omega$ -aga-IVA, mientras que al aumentar la concentración a 1  $\mu$ M se obtuvo una inhibición del 48%. Sin embargo, la especificidad es incierta a concentraciones altas (Luebke et al., 1993; Mintz et al., 1992; Takahashi y Momiya, 1993).

Se ha reportado que en registros extracelulares de sinapsis glutamatérgicas de la región CA1 del hipocampo, la  $\omega$ -Aga-IVA no tiene efecto a concentración de 100 a 200 nM (Wu y Saggau, 1994; Wheeler et al., 1994), mientras que provoca una inhibición significativa en la actividad sináptica registrada intracelularmente (Luebke et al., 1993; Takahashi y Momiya, 1993).

La razón de esta discrepancia es desconocida; una posible explicación es que la potencia de la  $\omega$ -Aga IVA disminuya cuando se incrementa la intensidad de estimulación (Luebke et al., 1993). Es posible que por esta razón se obtuvo una mayor inhibición cuando se estimularon las fibras cortico-estriatales a la mitad de la amplitud máxima.

Las dihidropiridinas (nisoldipina, nimodipina, nifedipina), son bloqueadores selectivos de canales de calcio tipo L. (Horne y Kemp, 1991; Grover y Teyler, 1990; Hirning et al., 1988; Luebke et al., 1993; Takahashi y Momiyama, 1993; Whittington y Little, 1991; Lovinger, et al. 1994). No presentan efecto en la transmisión sináptica, pero queda la duda si esto se debe a que su acción es dependiente del voltaje o si en realidad los canales tipo L no participan en la liberación del neurotransmisor.

La aplicación de dihidropiridinas sobre el potencial de campo se ha intentado con despolarizaciones con KCl y de condiciones de oscuridad para observar su efecto (Regan et al., 1990). En este trabajo se decidió utilizar otro bloqueador que no necesitase de condiciones especiales para resolver el punto.

La calciseptina es un péptido purificado del ofidio *Dendroaspis polylepis polylepis* y se ha demostrado que también bloquea selectivamente el canal de calcio tipo L (Weille et al., 1991). Con la aplicación de esta toxina, se obtuvo una inhibición del 16% (15 D) en la amplitud del potencial ortodrómico poblacional, (E) mientras que en el potencial sináptico intracelular no se vio afectado (I), lo que sugiere que no participan de manera relevante en la liberación del neurotransmisor.

La  $\omega$ -conotoxina MVHC es una toxina aislada del gasterópodo *Comus magus*, y que se ha sugerido bloquea los canales tipo Q de calcio (Randall et al., 1993; Sather, et al., 1993). Aun existe controversia acerca de la selectividad de esta toxina sobre los canales de calcio.

Algunos reportes indican que esta toxina inhibe canales de calcio N y Q (Sather et al., 1993; Randall et al., 1993; Wheeler et al., 1994), sin afectar a los canales de calcio tipo R (Zhang et al., 1993). Se ha reportado que la inhibición es dosis-dependiente, pues se observó un bloqueo del 76% con 150 nM (Wheeler et al., 1994).

Con el objetivo de conocer el efecto de esta toxina sobre el potencial ortodrómico  $N_p$ , se utilizó una dosis de 500 nM, y se observó una inhibición del 50%. Se han reportado resultados similares en la liberación de [ $^3H$ ] glutamato en sinaptosomas corticales (Turner et al., 1995). En sinapsis glutamatérgicas del área CA1 del hipocampo se reporta un bloqueo total (Wheeler et al., 1994), mientras que en las sinapsis corticoestriales se han reportado un 93% de inhibición de la porción insensible a la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Lovinger et al., 1994).

#### **EFFECTOS ADITIVOS DE $\omega$ -AGATOXINA Y $\omega$ -CONOTOXINA EN EL NEOESTRIADO**

En sinaptosomas de estriado que contienen terminales dopaminérgicas y gabaérgicas, se ha reportado un bloqueo del 60-80% en la liberación de [ $^3H$ ] dopamina, cuando se agregan  $\omega$ -conotoxina y  $\omega$ -agatoxina, sin embargo, esto no se observa con el

glutamato (Turner et al., 1992). Por otro lado, Dunlap et al (1993) reportan una inhibición sinérgica de estas toxinas sobre la liberación del [<sup>3</sup>H] glutamato 46% en sinaptosomas de hipocampo. En sinaptosomas de corteza cerebral se encontró un bloqueo parcial por  $\omega$ -agaIVA, sin encontrarse efecto con la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Turner et al., 1992).

Con el propósito de probar si ambas toxinas tienen efectos aditivos sobre la transmisión sináptica de las aferentes glutamatérgicas que proyectan hacia el neocórtico, se añadió la  $\omega$ -conotoxina GVIA (1  $\mu$ M), seguida de  $\omega$ -Aga IVA (200 nM). Las toxinas tuvieron efectos aditivos. De manera similar ocurrió cuando se administraron en orden inverso.

Como cada toxina por sí sola bloquea más del 50% de la transmisión (a estimulación semimáxima), se concluye que los efectos son aditivos. Esto se explicaría si ambos tipos de canal N y P están cerca de los sitios de liberación, o alternativamente, si la capacidad amortiguadora de Ca<sup>2+</sup> de estas terminales es suficientemente baja como para que el Ca<sup>2+</sup>, una vez en la terminal, siempre llegue hasta donde está la maquinaria de liberación.

Otra alternativa sería que las terminales cortico-estriatales usan un tipo de canal (N ó P) y las terminales tálamo-estriatales usen otro. Se piensa que esto es improbable, pues aunque la técnica no distingue entre ambos componentes, la estimulación se hizo en cuerpo caloso, por lo que necesariamente se estimuló de manera preferente el componente cortical. Ambas toxinas bloquearon el componente poblacional N<sub>2</sub> de manera similar.

Con un protocolo de pulsos pareados, se encontró una mayor facilitación con  $\omega$ -agatoxina IVA en comparación con el control de bicuculina, lo que demuestra el efecto presináptico de este péptido, ya que al bloquear la entrada de calcio a las terminales sinápticas, se simula las condiciones de bajo calcio que dan lugar a la facilitación de la liberación del neurotransmisor, mientras que con la calciseptina no hay efecto alguno, por lo que no participa de manera relevante en la liberación del neurotransmisor.

## CONCLUSIONES

Debido a que tanto la  $\omega$ -conotoxina GVIA como la  $\omega$ -agatoxina IVA bloquearon más del 50% de la transmisión aferente glutamatérgica (principalmente corticoestriatal), se concluye que la participación de los canales N y P es equivalente para la liberación de glutamato de estas terminales.

Más aún, debido a que los efectos de estas toxinas son aditivos, se llegó a la conclusión de que las toxinas están actuando sobre canales diferentes.

Como los efectos de ambas toxinas se suman, nos sugiere que o bien, ambos tipos de canal están cerca de la maquinaria de liberación, o los mecanismos de amortiguamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la terminal no son muy eficientes y sólo se necesita que los canales estén en la membrana de la terminal para que el  $\text{Ca}^{2+}$  que entre por ellos llegue a la maquinaria de liberación.

La acción de la  $\omega$ -conotoxina MVIIC puede explicarse porque la terminal posee canales tipo Q, o porque esta toxina bloquea canales tipo N. Se necesitarían realizar experimentos adicionales con esta toxina para saber cual de las dos posibilidades es la correcta.

La escasa acción de la calciseptina permite suponer que los canales tipo L no participan de manera relevante en la liberación del glutamato de las aferentes excitatorias del neocórtico.

El hecho de que el efecto de las toxinas disminuya cuando aumenta la intensidad de estimulación refuerza la evidencia de que son varios los tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que participan en la liberación de neurotransmisor de las terminales: cuando son pocas las

vesículas que van a ser liberadas, cualquiera de los tipos de canal que se bloquee (N, P ó Q) producirá gran inhibición. Sin embargo, mientras más vesículas se liberen (intensidad máxima), sólo se produce un 20% de inhibición en la liberación de neurotransmisor.

## BIBLIOGRAFIA

- \*- Audigier, S.M.P., Wang, J.K.T. y Greengard, P. (1988). Membrane depolarisation and carbamoylcholine stimulate phosphatidylinositol turnover in intact nerve terminales. *Proc. Natn. Acad. Sci, USA.* 85: 2859-2863.
- \*- Ahljianian, M.K., Striesnig, J., y Catterall, W.A. (1991). Phosphorylation of an  $\alpha$  1-like subunit of an  $\omega$ -conotoxin-sensitive brain calcium channel by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biol. Chem.* 266: 20192-20197.
- \*- Alger, B.E. y Taylor, T.J. (1976). Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3 and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 110: 463-480.
- \*- Arikuni, T. and Kubota, K. (1986). The organization of prefrontocaudate projection and their laminar origin in the macaque monkey: A retrograde study using HRP gel. *J. Comp. Neurol.* 244: 429-510.
- \*- Andersen, P. (1960). Interhippocampal impulses II. Apical dendritic activation of CA1 neurons. *Acta Physiol. Scandi.* 48: 178-208.
- \*- Bargas, J., Galarraga, E., Aceves, J. (1988). Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp. Brain. Res.* 72: 390-398.
- \*- Bargas, J., Howe A., Eberwine, J., Cao, Y., and Surmeier, J. (1994). Cellular and molecular characterization of  $Ca^{2+}$  currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14: 6667-6686.
- \*- Benfenati, F., Valtorta, F., Rubenstein, J.L., Gorelick, F.S., Greengard, P and Czernick, A.J. (1992) Synaptic vesicle associated  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* 359: 417-420
- \*- Bolam, J.P., Wainer, B.H., y Smith, A.D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12: 711-718.
- \*- Bolam, J.P., Clark, D.J., Smith, A.D., y Somogyi, P. (1983). A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [ $^3H$ ]gamma-aminobutyric acid: Combination of Golgi-staining, autoradiography and electronic microscopy. *J. Comp. Neurol.* 213: 121-134.
- \*- Bolam, J.P., Ingham, C.A., Izzo, P.N., Levy, A.I., Rye, D.B., Smith, A.D., y Wainer, B.H. (1986). Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: A double immunocytochemical study in the rat. *Brain Res.* 397: 279-289.
- \*- Buckle, P.J. y Haas, H.L. (1982). Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol.* 326: 109-122.
- Busch, C.B., and Sakmann, B. (1990). Cold Spring Harbor Symp. *Quant.* 55: 69-80.
- \*- Calabresi, P., Mercuri, N.B., Stefani, A., y Bernardi, G. (1990). Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons: An *in vitro* analysis. *J. Neurophysiol.* 63: 651-662.
- \*- Campbell, K.P., Leung, A.T., y Sharp, A.H. (1988). The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 11: 425-430.
- \*- Carbone, E y Lux, H.D. (1987). Single low-voltage activated calcium channels in chick and rat sensory neurons. *J. Physiol.* 386: 571-601.

- \*- Carbone E. y Swandulla, D. (1989). Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 54: 31-58.
- \*- Catterall, W.A.(1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.
- \*-Chandler, L.J., y Crews, F.T (1990). Calcium-versus G protein mediated phosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortical synaptoneurosome. *J. Neurochem.* 55: 1020-1030.
- \*-Chang, H.T., Wilson, C.J., y Kitai, S.T. (1981). Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: A light and electron microscopic study. *Science* 213: 915-918.
- \*-Chang, H.T., Wilson, C.J., y Kitai, S.T. (1982). A Golgi study of rat neostriatal neurons: Light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 208: 107-126.
- \*- Cherubini, E., Herrling, P.L., Laufumey, L., y Stanzione, P. (1988). Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones *in vitro*. *J. Physiol* 400: 677-690.
- \*- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23: 1261-1276.
- \*- Choi, D.W.(1988). Calcium- mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-468.
- \*- Cordingley, G.E y Weight, F. (1986). Non-cholinergic synaptic excitation in neostriatum: Pharmacological evidence for mediation by a glutamate-like transmitter. *Br. J. Pharmacol.* 88: 847-856.
- \*-DiFiglia, M., y Aronin, N. (1982). Ultrastructural features of immunoreactive somatostatin neurons in the rat caudate nucleus. *J. Neurosci.* 2:1267-1274.
- \*-DiFiglia, M., Pasik, P., y Pasik, T. (1976). A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114: 245-256.
- \*-DiFiglia, M., y Rafols, J.A. (1988). Synaptic organization of the globus pallidus. *J. Electron Microsc.* 10: 247-263.
- \*- Dubel, S.J., Starr, T.V.B., Hell, J., Ahljianian, M.K., Enygart, J.J., Catterall, W.A and Snutch, T.P. (1992). Molecular cloning of the  $\alpha$ -1 subunit of an  $\omega$ -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 5058-5062.
- \*- Dunwiddie, T.V. and Lynch, G.S. (1978). Long term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J. Physiol.* 276: 353-367.
- \*- Dunwiddie, T. y Fass, H. (1985). Adenosine increases synaptic facilitation in the *in vitro* rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J. Physiol.* 369: 365-377.
- \*- Dutar, P., Rascol, O., y Lamour, Y. (1989).  $\omega$ -conotoxin GVIA blocks synaptic transmission in the CA1 field of the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 174: 261-266.
- \*- Ellionor, P.T., Zhang, J.F., Randall, A.D., Zhou, M., Schwarz, T.L., Tsien R.W. and Horne, W.A (1993). Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* 363: 455-458.
- \*- Ewald, D.A., Sternweis, P.C., Miller, R. (1988). Guanine nucleotide-binding protein  $G_o$ -induced coupling of neuropeptide Y receptors to  $Ca^{2+}$  channels in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3633-3637.
- \*- Fatt, P., y Katz, B. (1950). Some observations in biological noise. *Nature.* 166: 597-598.
- \*- Fatt, P., y Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 117: 109-128.

- \*- Filloux, F., Karras, J., Imperial, J.S., Gray, W.R., y Olivera, B.M. (1994). The distribution of  $\omega$ -conotoxina MVIIIC<sub>site</sub>- binding sites in rat brain measured by autoradiography. *Neurosc. Lett.* 178: 263-266.
- \*- Finch, E.A., Turner, T.J., y Golding, S.M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 252: 443-446.
- \*- Fisher, R.S., Buchwald, N.A., Hull, C.D., y Levine, M.S. (1986). The gabaergic striatonigral neurons of the cat : demonstration by double peroxidase labeling. *Brain Res.* 398: 148-156.
- \*- Flores-Hernández J., Galarraga, E., Pineda, J.C., y Bargas, J. (1994). Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J. Neurophysiol.* 72(5): 2246-2256.
- \*- Fox, A.P., Nowycky, M.C., y Tsien, R.W. (1987a). Single channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394: 173-200.
- \*- Fox, A.P., Nowycky, M.C., y Tsien, R.W. (1987b). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394: 149-172.
- \*- Galarraga, E., Pacheco-Cano, M.T., Flores Hernández, J., y José Bargas (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp. Brain Res.* 100: 239-249.
- \*- Gerfen, C.R. (1984). The neostriatal mosaic: Compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311: 461-464.
- \*- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Mosma, F.J., y Sibley, D.R. (1990). D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurones. *Science* 250: 1429-1432.
- \*- Gollasch, M., Kleuss, C., Hescheler, J., y Schultz, G. (1993). G<sub>2</sub> and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in rat pituitary GH3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6265-6269.
- \*- Graybiel, A.M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *TINS.* 13: 244-253.
- \*- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W. y Kimura M. (1994). The Basal Ganglia and adaptative motor control. *Science.* 265: 1826-1831.
- \*- Grover, L.M., y Teyler, T.J. (1990). Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature.* 347: 477-479.
- \*- Gross, R.A., y Mc Donald, R.L. (1987). Dynorphin A selectively reduces a large transient (N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5469-5473.
- \*- Hell, J.W., Appleyard, S.M., Yokoyama, C.T., Warner, C., y Catterall, W.A. (1994). Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel  $\alpha$ 1- subunit which have different COOH termini. *J. Biol. Chem.* 269: 7390-7396.
- \*- Herrling, P.L. (1985). Pharmacology of the cortico-caudate excitatory postsynaptic potential in the cat: evidence for its mediation by quisqualate- or kainate-receptors. *Neuroscience* 14: 417-426.
- \*- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W., y Schulz, G. (1987). *Nature* 325: 445-447.
- \*- Hess, P. (1990). Calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev. Neurosc.* 13:317-356

- \*- Hillyard, D.R., Monje, V.D., Mintz, I.M., Bean, B.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoo-Nooz A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Imperial, J.S. y Olivera, B.M. (1992). A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 9: 69-77
- \*- Hirning, L.D., Fox, A.P., McCleskey, E.W., Olivera, B.M., Thayer, S.A., Miller, R.J., y Tsien, R.W. (1988). Dominant roles of N-type calcium channel in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*. 239: 57-61.
- \*- Hockberger, p., Toselli, M., Swandulla, D., y Lux D. (1989). A diacylglycerol analogue reduces neuronal calcium currents independently of protein kinase C activation. *Nature* 338: 340-342.
- \*- Hoffman, F., Biel, M., y Flockerzi. (1994). Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Ann.Rev. Neurosc.* 17: 399-418
- \*- Horne, A.L., y Kemp, J.A. (1991). The effect of  $\omega$ -conotoxin GVIA on synaptic transmission within the nucleus accumbens and hippocampus of the rat *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1733-1739.
- \*- Hosey, M.M., y Landzdunki, M. (1988). Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.* 104: 81-105.
- \*- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. and Flockerzi, V. (1992). Calcium channel  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *Embo J.* 11: 885-890.
- \*- Imredy, J.P. and Yue, D.T. (1992). Submicroscopic Ca<sup>2+</sup> diffusion mediates inhibitory coupling between individual Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 9: 197-207.
- \*- Jiang, Z.G., y North, R.A. (1990). Two types of neuron and their synaptic inputs in rat neostriatum. *Society for Neuroscience Abstracts*. 16: 417.
- \*- Jiang, Z.G., y North, R.A. (1991). Membrane properties and synaptic responses of two types of rat striatal neurones *in vitro*. *J. Physiol. Lond.* 443: 533-553.
- Johnston, D. y Sin Wu S.M. (1995). Extracellular field recordings. En: *Foundations of cellular neurophysiology*. (Ed. MIT Press). Cambridge, Massachusetts. London, England. 423-439.
- \*- Junge, D (1992). Synaptic transmission. En: *Nerve and muscle excitation*. 3a. ed. (Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers) Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 166-193.
- \*- Kamiya, H., Sawada, S., y Yakamoto, C. (1988). Synthetic  $\omega$ -conotoxin blocks synaptic transmission in the hippocampus *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 91: 84-88.
- \*- Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A. y Schwartz, J.H. (1991). Synaptic Transmission. En: *Principles of neural science*. 3a ed. (Ed. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M.). Elsevier. New York. 123-134.
- \*- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13: 4908-4923.
- \*- Kita, H. (1993). GABAergic circuits of the striatum. *Brain Res.* 99: 51-72.
- \*- Katz, B., y Miledi, R. (1967b). The role of calcium action during neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 189: 535-544.
- \*- Katz, B., y Miledi, R. (1967a). A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol.* 195: 481-492

- \*- Kemp, J.M., y Powell, T. P.S. (1971). The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos. Trans. Soc. Lond.* 262: 403-412.
- \*- Kerr, L.M, y Yoshikami, D. (1984). A venom peptide with novel presynaptic blocking action. *Nature* 308: 282-284.
- \*- Keyzer, J y Maki, L.W. (1992). Conditional probability analysis for a domain model of Ca<sup>2+</sup> inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys. J.* 63: 291-295.
- \*- Keyzer, D.O, y Alger, B.E. (1990). Arachidonic acid modulates hippocampal calcium current via protein kinase C and oxygen radicals. *Neuron* 5: 545-553.
- \*- Kitai, S.T., Kocsis, J.D., Preston, R.J., y Sugimori, M. (1976). Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 109: 601-606.
- \*- Kita, H., y Kitai, S.T. (1988). Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in cat neostriatum: Their morphological types and populations. *Brain Res.* 447: 346-352.
- \*- Koch, W.J., Ellionor, P.T. and Swartz, A. (1990). cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. *J. Biol. Chem.* 112: 235-242.
- \*- Lindgren, C.A., and Moore, J.W. (1989). Identification of ionic currents at presynaptic nerve endings of the lizard. *J. Phys. Lond.* 414: 201-222.
- \*- Lipscombe, D., and Tsien, R.W. (1987). Noradrenaline inhibits N-type calcium channels in frog sympathetic neurones. *J. Physiol.* 377: 397.
- \*- Llinas, R., Sugimori, M., Lin, J.W., and Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1689-1693.
- \*- Locke, F.S. (1894). Notiz uber den Einfluss physiologischer Kochsalzlosung auf die elektrische Erregbarkeit von muskel und nerv. *Zentralbl. Physiol.* 8: 166-167.
- \*- Lomo, T. (1971). Potentiation of monosynaptic EPSP in the perforant path-dentate granule cell synapse. *Exp Brain Res.* 12: 46-63.
- \*- Lovinger, D.M., Merrit, A., y Reyes, D. (1994). Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neurosci.* 26: 31-40.
- \*- Lovinger, D.M., Tyler, E., Fidler, S., y Merritt, A. (1992). Properties of presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J. Neurophysiol.* 69: 1236-1244.
- \*- Lovinger, D., Tyler E.C., and Merrit A. (1993). Short and long term depression in rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* 70: 1937-1947.
- \*- Luebke, J., Dunlap, K., y Turner, T.J. (1993). Multiple calcium channels types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron.* 11: 895-902.
- \*- Lundy, P.M., Frew, R., Fuller, T.W., y Hamilton, M.G. (1991). *Eur. J. Pharmacol.* 206: 61-68
- \*- Malenka, R.C. y Kocsis, J. (1988). Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neurosc.* 8: 3750-3756.
- \*- McCleskey, E.W. (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Op. Neurobiol.* 4: 304-312.
- \*- McGeer, P.L., McGeer, E.G., Scherer, U., y Singh, K. (1977). A glutamatergic corticostriatal path? *Brain Res.* 128: 369-373.
- \*- McGeorge, A.J., y Gault, R.I.M. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience.* 29: 503.

- \*-Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiy, S. y Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiacdihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340: 230-233.
- \*- Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B. P., y Adams, M.E. (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga IVA. *Nature*. 355: 827-829.
- \*- Mintz, I.M. y Bean, B.P. (1993). GABA<sub>B</sub> receptor inhibition of P-type Ca<sup>2+</sup> channels in central neurons. *Neuron* 10: 889-898.
- \*- Mintz, I.M., Sabatini, B.L., y Regehr, W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron*. 15: 675-688.
- \*- Misgeld, U., and Hassler, R. (1979). Locally evoked potential in slices of rat neostriatum. A tool for investigation of intrinsic excitatory process. *Exp Brain Res*. 34. 575-590.
- \*- Monje, V.D., Haack, J.A., Naisbitt, S.R., Miljanich, G., Ramachandran, J., Olivera B.M., Hylliard, D.R., y Gray, W.R (1993). A new conus peptide ligand for Ca channel subtypes. *Neuropharmacology*. 32: 1141-1149.
- \*- Mori, A., Takahashi, Miyashita, Y., and Kasai, H. (1994). Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired pulse depression. *J. Physiol. Lond.* 476:217-228.
- \*- Nachshen, D.A. (1984). Selectivity of the Ca binding site in synaptosome Ca channels. *J. Gen. Physiol.* 83: 941-967.
- \*- Nelson, M.T. (1986). Interactions of divalent cations with single calcium channels from rat brain synaptosomes. *J. Gen. Phys.* 87: 201-222
- \*- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 312: 121-127.
- \*-Oertel, W.H., y Mugnaini, E. (1984). Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett.* 47: 233-238.
- \*- Ouimet, C.C., McGuinness, T.L. y Greengard, P. (1984). Immunocytochemical localization of calcium calmodulin dependent kinase II in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 5604-5608
- \*- Peng, Y.W., Sharp, A.H., Snyder, S.H. y Yau, K.W. (1991). Localisation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in synaptic terminals in the vertebrate retina. *Neuron* 6: 523-531.
- \*- Perney, T.M., Hirning, L.D., Ieeman, S.E., y Miller, R.J. (1986). Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc. Natl. Acadl. Sci. US*. 83: 6656-6659.
- \*-Phelps, P.E., Houser, C.R., y Vaughn, J.E. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.* 238: 286-307.
- \*- Rane, S.G., Walsh, M.P., McDonald, J.R. y Dunlap K (1989). Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current. *Neuron* 3: 239-245.

- \*- Regan, M.H., Kocsis, J.D., Waxman, S.G. (1990). Depolarization-dependent actions of dihydropyridines on synaptic transmission *in vitro* in rat hippocampus. *Brain Res.* 527: 181-191.
- \*-Regar, L.G.(1991). Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J.Neurosci.* 11: 2259-2269.
- \*- Regan, L.J., Sah, D.W y Bean, B.P. (1991). Ca<sup>2+</sup> channels in rat central and peripheral neurons: high threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron* 6: 269-280.
- \*- Reynolds, I.J., Wagner, J.A., Snyder, S.H., Thayer, S.A., Olivera, B.M., y Miller, R.J. (1986). Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by  $\omega$ -conotoxin GVIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8804-8807.
- \*- Rivier, J, Galyean, R., Gray, R., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J y Olivera, B.M (1987). Neuronal calcium channel inhibitors: Synthesis of  $\omega$ -conotoxina GVIA and effects of <sup>45</sup>Ca uptake by synaptosomes. *J.Biol. Chem.* 262: 1194-1198
- \*- Royce, G.J.(1982). Laminar origin of cortical neurons which project upon the caudate nucleus: A horseradish peroxidase investigation in the cat. *J.Comp. Neurol.* 205: 8-29.
- \*- Royce, G.J y Bromley, S. (1984). Fluorescent double labeling studies of thalamostriatal and corticostriatal neurons. En: *The basal ganglia. Structure and function.* (Ed. McKenzie, J.S., Keen, R.E., and Wilcox, L.N.) Plenum Press, New York:
- \*-Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Nori, Y., Adams, M.E. y Tsien, R.W. (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A ( $\beta$ 1) calcium channels alpha 1 subunits. *Neuron* 11: 291-303.
- \*- Sather, W.A., Yang, I., and Tsien, R.W. (1994). Structural basis of ion channel permeation and selectivity. *Curr. Op. Neurobiol.* 4: 313-323.
- \*- Scott, R.H., Pearson, B.A y Dolphin, A.C. (1991). Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. *Prog. Neurobiol.* 36: 485-520.
- \*- Seabrock, G.R., Howson, W., y Lacey, M.G. (1991). Subpopulations of GABA-mediated synaptic potentials in slices of rat dorsal striatum are differentially modulated by presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors. *Brain Res.* 562: 332-334.
- \*- Sherman, A., Keizer, J y Rinzel, J. (1990). Domain model for Ca<sup>2+</sup> inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels at low channel density. *Biophys. J.* 58: 985-995.
- \*- Sher, E., y Clementi, F. (1991).  $\omega$ -Conotoxin sensitive voltage-operated calcium channels in vertebrate cells. *Neuroscience* 42: 301-307.
- \*- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., y Molinoff, P.B. (1994). Basic Neurochemistry. En: *Chemically mediated synaptic transmission.* 5a ed (Ed. Raven Press). New York. 182-184.
- \*- Snutch, T.P., Leonard, J.P., Gilbert, M.M., Kester, H.A., y Avisaon N. (1990). Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3391-3395.
- \*- Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R. y Snutch, T.P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low-voltage-activated calcium channel family. *Science* 260: 1133-1136.
- \*- Starr, T.V.B., Prystay, W. y Snutch, T.P. (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5621-5625.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- \*- Surmeier, C.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Nair, A.C., y Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D<sub>1</sub> dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*. 14: 1-20.
- \*- Suszkiw, J.B., Murawsky, M.M y Shi M. (1989). Further characterization of phasic calcium influx in rat cerebrocortical synaptosomes: Inferences regarding calcium channel types in nerve endings. *J. Neurochem* 52: 1260-1269.
- \*- Swandulla, D., Carbone, W., y Lux, H.D. (1991). Do calcium channels classifications account for neuronal for neuronal calcium channel diversity?. *Trends Neurosc.* 14: 46-51.
- \*- Swartz, K.J., Merrit, A., Bean, B.P y Lovinger, D.M. (1993). Protein Kinase C modulates glutamate receptor inhibition or Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission. *Nature* 361: 165-168.
- \*- Takagi, H., Somogyi, P., Somogyi, J., y Smith, A.D. (1983). Fine structural studies of a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study. *J.Comp. Neurol.* 214: 1-16.
- \*- Takahashi, T., y Moniyama, A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*. 366: 156-158.
- \*- Tanabe, Y., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, Takahashi, H., y Kangawa, K. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. 328: 313-318.
- \*- Tareilus, E., Schoch, J., Adams, M.E. y Breer, H. (1993). Analysis of rapid calcium signals in synaptosomes. *Neurochem. Int.* 23: 331-341.
- \*- Tareilus, E., Schoch, J. y Breer, H. (1994). Ca<sup>2+</sup> dependent inactivation of P-type calcium channels in nerve terminals. *J. Neurochem.* 62: 2283-2291.
- \*- Tareilus, E and Breer, H. (1995). Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation. *Neurochem. Int.* 26: 539-558.
- \*- Thompson, S.M., Capogna, M., y Scanzini, M. (1993). Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 16 : 396-397.
- \*- Trautwein, W y Hescheler, J. (1990). Regulation of cardiac calcium current by phosphorylation and G proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 527-574.
- \*- Tsien, R.W., Hess, P., McCleskey, E.W. y Rosenberg, R.D. (1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 16: 265-290.
- \*- Tsien, R.W., Ellionor, P.T., y Horne, W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmac. Sci.* 12: 349-354.
- \*- Turner, T.J., Adams, M.E., y Dunlap, K. (1992). Calcium channels coupled to glutamate release identified by  $\omega$ -aga-IVA. *Science*. 258: 310-313.
- \*- Turner, T.J., Adams, M.E., y Dunlap, K. (1993). Multiple Ca<sup>2+</sup> channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 9518-9522.
- \*- Turner, T.J., Lampe, R.A., y Dunlap, K. (1995). Characterization of presynaptic calcium channels with  $\omega$ -conotoxin MVIIC and  $\omega$ -grammotxin S1A: Role for a resistant calcium channel type in neurosecretion. *Mol. Pharm.* 47: 348-353.
- \*- Uchitel, O.D., Protti, D.A., Sanchez, V., Cherksey, B.D., Sugimori, M., y Llinas, R (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx

and transmitter release in mammalian synapses. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3330-3333.

\*- Wanke, E., Ferroni, A., Malgaroli, A.Q., Ambrosini, A., Pozzan, T., y Meldolesi, J. (1987). Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated  $Ca^{2+}$  current in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4313-4317.

\*- Weille, J.R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., y Lazdunski, M. (1991). Calciseptine, a peptide isolated from black bamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:2437-2440.

\*- Wheeler, D.B., Randall, A., y Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type  $Ca^{2+}$  channels in supporting synaptic transmission. *Science*. 264: 107-111.

\*- Whittington, M.A., y Little, H.J. (1991). Nitrendipine given during drinking, decreases the electrophysiological changes in the isolated hippocampal slice, seen during ethanol withdrawal. *Br. J. Pharm.* 103: 1677-1684.\*- Williams, M.E., Feldman, D.J., McCue, A.F., Brenner R., \*

\*- Velicelebi, G., Ellis, S.B. y Harpold, M.M. (1992). Structure and functional expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*. 8: 71-84.

\*- Wilson CJ (1990) The basal ganglia. En: *The Synaptic Organization of the Brain* 3a. ed. (Ed.: Shepherd GM). Oxford U.P., New York. pp: 279-316.

\*- Wilson, C.J., y Groves, P.M. (1980). Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: A study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 194: 599-616.

\*- Wilson, C.J (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. En: *Chemical signaling in the basal ganglia*. Ed. G.W. Albuttmott and P.C Emson.

\*- Wilson, C. (1994). The contribution of cortical neurons to the firing pattern of striatal spiny neurons. En: *Models of information processing in the basal ganglia*. (Ed. J.C. Houk, J.L. Davis and J.L. Beiser). MIT Press, Cambridge, Mass.

\*- Wu, L., y Saggau, P. (1994). Presynaptic calcium is increased during synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* 14: 645-654.

\*- Wu, L., y Saggau, P. (1995). Block of multiple presynaptic calcium channel types by  $\omega$ -conotoxin MVIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses. *J. Neurophys.* 5: 1995.

\*- Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellionor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwartz, T.L., y Tsien, R.W. (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal  $Ca^{2+}$  channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neurpharm.* 32: 1075-1088.