

670  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

101.00372-1999-1996

MODULACION COLINERGICA DEL PATRON  
TEMPORAL DE DISPARO DE LAS NEURONAS  
NEOESTRIATALES

**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 :**

**NORMA ALEJANDRA FIGUEROA RIOS**



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS 1996  
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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

MODULACION COLINERGICA DEL PATRON TEMPORAL DE DISPARO DE LAS NEURONAS NEOESTRIATALES.

realizado por NORMA ALEJANDRA FIGUEROA RIOS

con número de cuenta 8805221-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

DRA. MA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

Propietario

DRA. NORTENCIA GONZALEZ GOMEZ

Propietario

DRA. MA. TERESA BENITEZ RODRIGUEZ

Suplente

BIOLOGO, JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO

Suplente

BIOLOGO, ARMANDO MUÑOZ GONZALEZ

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL  
DE BIOLOGIA

*[Handwritten signatures and initials]*

*[Handwritten signature]*

DEDICO ESTE TRABAJO A MI PAPA Y A MI MAMA (RUBEN Y ANITA), POR HABERME TOLERADO  
Y ENSEÑADO A NO DEJARME VENCER EN NINGUN MOMENTO.  
GRACIAS POR HABERME MOSTRADO LA UNIVERSIDAD DESDE PEQUEÑA.

A MIS HERMANOS : SONIA Y RUBEN (ENANO), PORQUE SIEMPRE ME AYUDARON O POR LO  
MENOS ME ECHARON PORRAS

LOS QUIERO!

A HOMERO PORQUE EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS ESTAS CONMIGO ☺ \*

AL CLUB DE LOS 9 + 1 (MARITZA, DOLORES, JAINA, ANGELICA, GABY, LILIA, ELIA, CLARA Y  
JUAN). SI, SON 9 PERO RECUERDEN QUE FALTO YO. QUE EQUIPO!

Y POR SUPUESTO A MIS AMIGOS QUE DURANTE LA CARRERA Y DESPUES DE ELLA SEGUIMOS  
ESTANDO JUNTOS, NO IMPORTA DONDE NOS ENCONTREMOS...

AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SU REVISION Y

SUGERENCIAS.

DRA. MA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO.

DRA. MA. TERESA BENITEZ RODRIGUEZ.

DRA. HORTENCIA GONZALEZ GOMEZ.

BIOLOGO. JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO.

BIOLOGO. ARMANDO MUÑOZ COMONFORT.

Esta tesis fue realizada en los laboratorios 123-norte y  
125-norte del Instituto de Fisiología Celular de la  
Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de  
la doctora en ciencias Elvira Galarraga Palacio.

## INDICE

I. RESUMEN .....	3
II. INTRODUCCION .....	4
A) El neocestriado .....	8
i) Neuronas espinosas medianas .....	8
ii) Interneurona gigante no espinosa .....	9
iii) Receptores muscarínicos .....	13
B) Disparo neuronal .....	17
i) El postpotencial hiperpolarizante .....	21
ii) Diferencias entre los potenciales de acción de un tren provocados por un pulso cuadrado de corriente .....	25
C) Neuromodulación .....	28
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	36
IV. OBJETIVOS .....	36
V. METODO .....	37
A) Registro intracelular .....	38
i) Protocolo experimental 1 .....	41
ii) Protocolo experimental 2 .....	41
B) Registro de fijación de voltaje .....	42
VI. RESULTADOS .....	45
A) Características electrofisiológicas de las neuronas del neocestriado .....	45
B) Efecto del carbacol sobre la relación corriente-voltaje (I/V) .....	51
C) Efecto del carbacol sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un tren de potenciales de acción .....	54
D) Participación de las corrientes transitorias .....	60

E) Que tanto participan las corrientes persistentes .....	67
F) Efecto de los bloqueadores de la gK .....	73
<b>VII. DISCUSION .....</b>	<b>85</b>
A) Características electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas del neoestriado .....	85
B) Efectos del carbacol sobre la resistencia de entrada de las neuronas neoestriatales .....	86
C) Efectos del carbacol sobre el postpotencial hiperpolarizante .....	87
D) Efectos de la 4-AP sobre el postpotencial hiperpolarizante .....	89
E) Participación de las corrientes persistentes .....	90
F) Efectos de la apamina sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un tren de potenciales de acción .....	91
<b>VIII. CONCLUSION .....</b>	<b>92</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>95</b>



## RESUMEN

En el disparo neuronal los potenciales de acción son seguidos por un postpotencial hiperpolarizante (PPH) que modula el disparo repetitivo, el cual usualmente se debe a la activación de corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . Este influjo de  $Ca^{2+}$  conduce a la activación de cuando menos dos tipos de corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$  las cuales contribuyen a la generación del PPH y a la repolarización del PA en neuronas neostriatales. Si el PPH que sigue a un sólo potencial de acción es modulado por el agonista colinérgico carbacol y en tal evento existe la participación de conductancias de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$ , entonces el PPH que sigue a un tren de PAs debe de ser igualmente modulado por el carbacol, aunque quizás las conductancias participantes en el PPH post descarga no sean las mismas, pues los intervalos entre espigas provocados difieren en función del tiempo que dura la estimulación. Además los PAs finales son más prolongados que los PAs del inicio del pulso.

Para este estudio se realizaron registros intracelulares en neuronas espinosas medianas en rebanadas de cerebro de ratas Wistar. En este trabajo se demostró que el carbacol reduce el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un tren de potenciales de acción en las neuronas espinosas medianas del neostriado de la rata. También aportamos algunas evidencias de que el carbacol podría estar actuando sobre conductancias activadas por  $Ca^{2+}$  y no sobre conductancias sensibles a 4-AP o TEA.

## INTRODUCCION

Los ganglios basales están formados por 5 núcleos estrechamente relacionados: caudado, putamen, globo pálido, núcleo subtalámico y substancia nigra, dichos núcleos no reciben entradas sensoriales directamente y como en el caso del cerebelo, no envían salidas motoras a la médula espinal. Sin embargo no hay duda de que estas estructuras están involucradas en el control del movimiento voluntario y la postura (Wilson, 1990; Albin et al., 1989; McGeer y McGeer, 1993).

Las lesiones de los ganglios basales, en el hombre y en modelos experimentales con animales, presentan algún trastorno del movimiento como su síntoma primario (Rothwell, 1987; Ohye et al., 1991; Wilson, 1990; Albin et al., 1989; McGeer y McGeer, 1993). Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, los movimientos son muy difíciles de realizar y hay signos de rigidez muscular y resistencia a los cambios de posición. Mientras que, en la enfermedad de Huntington, movimientos inútiles y sin dirección interfieren con la ejecución de movimientos útiles y dirigidos (Wilson, 1990; McGeer y McGeer, 1993).

La enfermedad de Parkinson, en particular, ha tenido una fuerte influencia para el estudio de la función de los ganglios basales y ha llevado a la hipótesis de que están involucrados en la ejecución automática de movimientos motores aprendidos (Albin et al., 1989; Graybiel et al., 1994). La principal porción de los ganglios basales está formada por 3 grandes núcleos: el caudado, el putamen y el globo pálido. Estos 3 núcleos están situados

subcorticalmente, laterales al tálamo y separados de éste por la cápsula interna (Rothwell, 1987).

La estructura aferente primaria de los ganglios basales es el núcleo estriado, en algunos mamíferos (como la rata), el estriado es una sola estructura, pero en la mayoría de ellos (como en el hombre) consta de 2 porciones, el caudado medial y el putamen lateral, divididos por las fibras de la cápsula interna (Albin et al., 1989). Filogenéticamente las partes más nuevas del estriado (caudado y putamen) son conocidas como el neoestriado (Rothwell, 1987). Estos dos núcleos (caudado y putamen) están íntimamente asociados con las funciones sensoriomotoras del sistema nervioso central del mamífero (Wilson, 1990). El término estriado es descriptivo de su apariencia en secciones en que se tiñe la mielina, en las cuales se observan fibras conocidas como lápices de Wilson que cruzan el núcleo, dándole una apariencia rayada o estriada (Rothwell, 1987).

Los núcleos caudado y putamen reciben entradas prácticamente de toda la corteza (áreas de asociación cortical, sensoriales y motoras). Adicionalmente, reciben entradas del núcleo intralaminar talámico, dopaminérgicas de la sustancia nigra (pars compacta) y serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe. Similares conexiones pero surgiendo de la corteza límbica y del hipocampo recibe una tercera estructura, el núcleo acumbens. Estos tres núcleos (caudado, putamen y acumbens) son muy similares en su estructura interna y son frecuentemente referidos juntos como el neoestriado, ellos reciben la mayoría de las fibras que entran

a los ganglios basales de otras partes del cerebro (Wilson, 1990).

Los principales blancos o salidas del neocórtex son tres núcleos: el segmento externo del globo pálido, el segmento interno del globo pálido, y la sustancia nigra pars reticulata.

Estas dos últimas estructuras son muy similares en su organización celular, proyectan a estructuras fuera de los ganglios basales y proporcionan el principal camino de salida de las operaciones neuronales ejecutadas dentro de los ganglios basales. Sus blancos están principalmente en el tálamo (la mayor parte en la hilera ventral del núcleo talámico el cual proyecta a la corteza frontal), núcleo habenuar lateral y en las capas profundas del colículo superior (Wilson, 1990).

El segmento externo del globo pálido proyecta principalmente al núcleo subtalámico, un pequeño pero importante componente de los ganglios basales que a su vez proyecta al globo pálido y sustancia nigra. Entradas externas a los ganglios basales pueden llegar al sistema por varios puntos, incluyendo el núcleo subtalámico, sustancia nigra, y globo pálido, sin embargo la mayoría de las entradas a los ganglios basales, como ya se mencionó, se encuentran a nivel del neocórtex, (Wilson, 1994) ver figura 1.

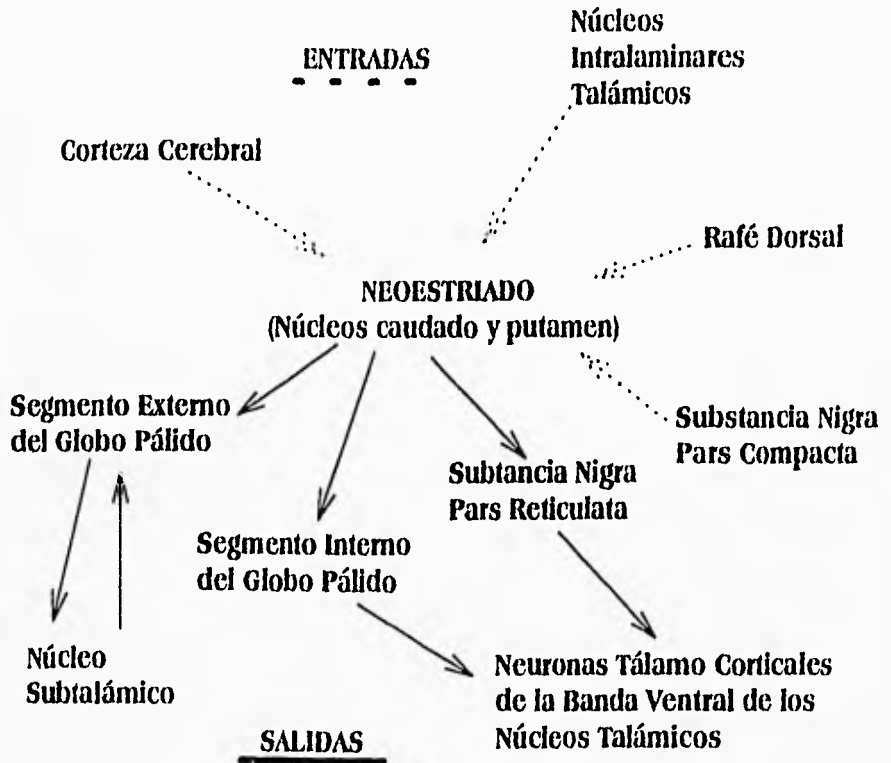


Figura 1. Se muestran esquemáticamente las principales conexiones (entradas y salidas o blancos) del neostriado (Modificado de Wilson, 1990).

## EL NEOESTRIADO

En el neoestriado al menos seis diferentes tipos de neuronas han sido distinguidas morfológicamente con base en sus características somatodendríticas utilizando la técnica de Golgi en gato, mono, hombre y rata (Preston et al., 1980; Chang et al., 1982; Difiglia y Carey, 1986; Kemp y Powell, 1970).

Una de estas neuronas proyecta sus axones fuera del núcleo, siendo la neurona principal o de proyección. Los otros tipos neuronales son clasificados como interneuronas, es decir, conectan con elementos dentro del núcleo.

### NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS

Un tipo neuronal del estriado de tamaño somático mediano que no presenta espinas ni en el soma ni en los troncos dendríticos más proximales, pero sí densas espinas en el árbol dendrítico distal son denominadas como neuronas espinosas medianas (Preston et al., 1980).

La densidad en el neoestriado de las neuronas espinosas medianas (neuronas espinosas) es de aproximadamente el 95% de su población neuronal. Estas neuronas tienen un soma promedio de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, es usualmente redondo u oval en su forma y emite de 3-5 dendritas principales las cuales se dividen posteriormente originando las dendritas más distales (Preston et al., 1980). Una de las características de las neuronas espinosas estriatales es que conforman la salida del núcleo, es decir, son las neuronas de

proyección del neocóstriado (Wilson, 1994., Preston et al., 1980).

Las neuronas espinosas medianas sintetizan y liberan ácido gama amino butírico (GABA), y coliberan sustancia P (SP) y/o encefalinas (ENK) (Wilson, 1990; Pasik et al., 1989; Jiang y North, 1991). Son poderosamente inhibitorias en sus efectos sobre sus neuronas blanco del globo pálido y sustancia nigra (Precht y Yoshida, 1971; Fonnum et al., 1974; Ribak et al., 1976), núcleos de salida del neocóstriado.

Estas neuronas reciben entradas monosinápticas de la corteza (Somogyi et al., 1981; Mc George y Faull, 1989), así como del complejo parafascicular-centromedial (núcleos intralaminares) en el tálamo (Mehler, 1966; Beckstead, 1984) y de la sustancia nigra compacta en el cerebro medio (Beckstead et al., 1979; Gerfen et al., 1987). Adicionalmente a este tipo neuronal de proyección que conforma  $\approx 90\%$  de las células del núcleo en la rata, se han descrito en el neocóstriado 3 tipos de interneuronas: gabaérgicas, somatostatinérgicas y colinérgicas las cuales a diferencia de las neuronas de proyección no presentan espinas en sus dendritas (Kemp y Powell, 1970; Preston et al., 1980; Chang et al., 1982; Difiglia y Carey, 1986).

#### **INTERNEURONA GIGANTE NO ESPINOSA**

Los componentes colinérgicos más prominentes de los ganglios basales están en el neocóstriado y en la porción más interna del

globo pálido. Neuronas inmunoreactivas a ChAT son también encontradas en el núcleo acumbens.

Las neuronas inmunoreactivas a ChAT del neostriado son clasificadas como grandes (18-25  $\mu\text{m}$  de diámetro somático, de acuerdo a Sofronier et al, 20-44 $\mu\text{m}$  diámetro somático, de acuerdo a Paxinos y Butcher, y 50 a 60  $\mu\text{m}$  en su diámetro somático menor de acuerdo a Wilson).

En la figura 2 se muestra el esquema de una interneurona colinérgica reconstruida (Wilson et al, 1990). Este tipo de neuronas se caracterizan por no presentar espinas en sus dendritas y a diferencia de las neuronas espinosas de proyección tienen un axón que se ramifica extensamente dentro del núcleo estriado; por lo que a pesar de su baja proporción 1-3% en el neostriado hacen de este núcleo una de las áreas cerebrales con mayor concentración de acetilcolina y sus enzimas (Wilson et al., 1990; Cuello, 1987; Miyoshi et al., 1991).



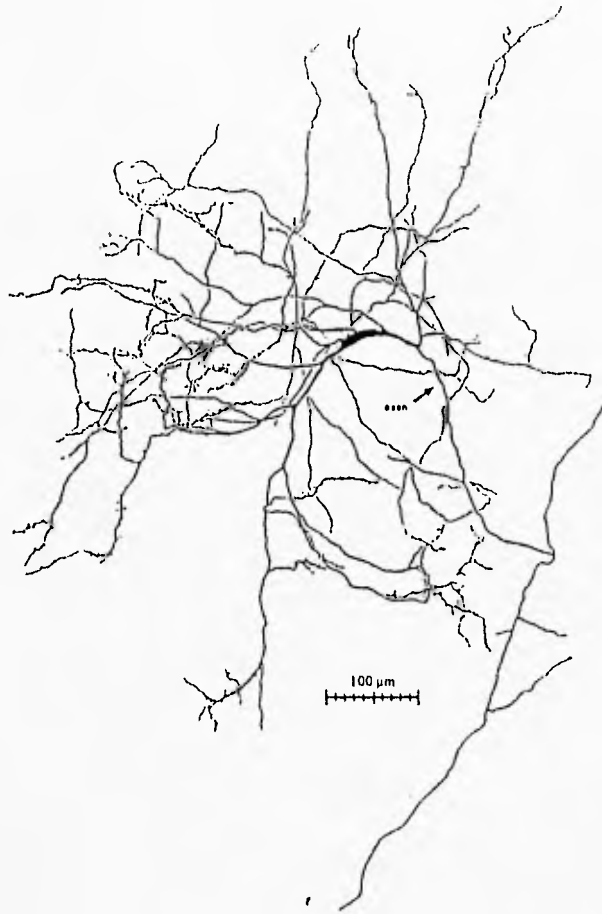


Figura 2. Esquema que muestra la anatomía de una neurona gigante no espinosa "colinérgica" (Tomada de Wilson et al, 1990).

Por su baja densidad en el neocóstriado, existen pocos registros en estas neuronas. Sin embargo algunos registros intracelulares realizados, muestran que estas células presentan actividad espontánea, irregular y mayor duración de los potenciales de acción que las neuronas espinosas medianas (Wilson et al., 1990; Kawaguchi, 1992).

Se ha demostrado un decremento de marcadores colinérgicos en la corteza cerebral en casos de enfermedad de Alzheimer (Davies et al., 1976). Este déficit cortical colinérgico ha sido atribuido a la pérdida de células en el núcleo basal magnocelular y sugiere ser la causa primaria de algunas manifestaciones clínicas (Nicholls et al., 1992).

En contraste, no es significativa la reducción en la concentración de ChAT o acetilcolinesterasa en el cóstriado de pacientes con enfermedad de Parkinson. Las neuronas colinérgicas cóstriales permanecen normales en dicha enfermedad y no es sorprendente que las enzimas relacionadas al metabolismo de la ACh también permanezcan normales. Sin embargo, el mejoramiento de los síntomas del Parkinson por drogas anticolinérgicas es bien conocido, así como el agravamiento de los síntomas por fisostigmina, indicando una dominancia o incremento en la actividad colinérgica en la enfermedad de Parkinson (Shubert, 1977; Tarsy, 1979).

A diferencia de otros núcleos del cerebro que reciben su inervación de ACh a través de aferentes provenientes de otros núcleos, el neocóstriado tiene su inervación de ACh propia ya que son las interneuronas ACh las que proveen la ACh al neocóstriado.

Evidencias considerables de estudios en animales y humanos sugieren que los sistemas colinérgicos son importantes para el aprendizaje, memoria, percepción y para la regulación de las funciones motoras (Nicholls et al., 1992; Schubert, 1977).

Está bien establecido que las neuronas colinérgicas estriatales son controladas por las aferentes nigroestriatales dopaminérgicas y rutas serotoninérgicas rafé-estriatales. Las neuronas gabaérgicas intraestriatales y rutas glutamatérgicas cortico-estriatales son también capaces de regular la actividad colinérgica estriatal, además se sugiere que las interneuronas estriatales colinérgicas reciben una entrada excitatoria tónica de la corteza cerebral, la cual utiliza un aminoácido excitatorio, L-glutamato, ó L-aspartato, como neurotransmisores (Scatton, 1987; Ladinsky et al., 1977). En el neostriado la liberación de acetilcolina es modulada por receptores muscarínicos presinápticos (Weiler et al., 1984; Hernández - Echegaray et al., 1996).

#### RECEPTORES MUSCARÍNICOS

La acción más reproducible de la ACh actuando en receptores muscarínicos es reduciendo las conductancias de K<sup>+</sup>, esta observación ha sido extendida al analizar una variedad de corrientes de K<sup>+</sup> distintas:

Por ejemplo, en células piramidales hipocampales, la activación de receptores muscarínicos causa un decremento de 4 corrientes de K' distintas:

- 1) Una corriente de K' de fuga.
- 2) Una corriente de K' activada por  $Ca^{2+}$ .
- 3) Una inactivación de la corriente de K' dependiente de voltaje llamada  $I_{Kv}$ .
- 4) Una corriente transitoria voltaje-dependiente llamada  $I_{Kt}$ .

Los receptores muscarínicos metabotrópicos son los receptores para la ACh dominantes en el sistema nervioso central de mamíferos. Farmacológicamente ha sido posible dividir a los receptores muscarínicos en 2 subclases: M1 y M2, basados en su relativa sensibilidad al antagonista pirenzepina (Nicoll et al., 1990; Nicholls, 1994; Dutar y Nicoll, 1988).

No obstante estudios de clonación molecular han identificado al menos 5 subclases (Nicoll et al., 1990).

Desde el advenimiento de las preparaciones en rebanada un gran número de estudios sobre la acción de la ACh se han realizado en varias regiones del cerebro, encontrándose una gran variedad de acciones; las cuales incluyen una acción nicotínica involucrada en la depolarización rápida debido a un incremento en la conductancia catiónica y ocho acciones muscarínicas bien caracterizadas:

- 1) Una depolarización lenta debida a un incremento en una conductancia catiónica.

- 2) Una depolarización lenta debida a un decremento en una conductancia de  $K'$  de fuga.
- 3) Un decremento en la conductancia de  $K'$  dependiente de voltaje llamada  $I_H$ .
- 4) Un decremento en la conductancia de  $K'$  activada por  $Ca^{2+}$  llamada  $I_{AHF}$ .
- 5) Un decremento en la conductancia de  $K'$  activada por  $Na^+$ .
- 6) Un decremento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.
- 7) Una hiperpolarización debida a un incremento en la conductancia de  $K'$ .
- 8) Un decremento en la  $I_A$ .

(Nicholls et al., 1992; Nicoll et al., 1990), ver figura 3.

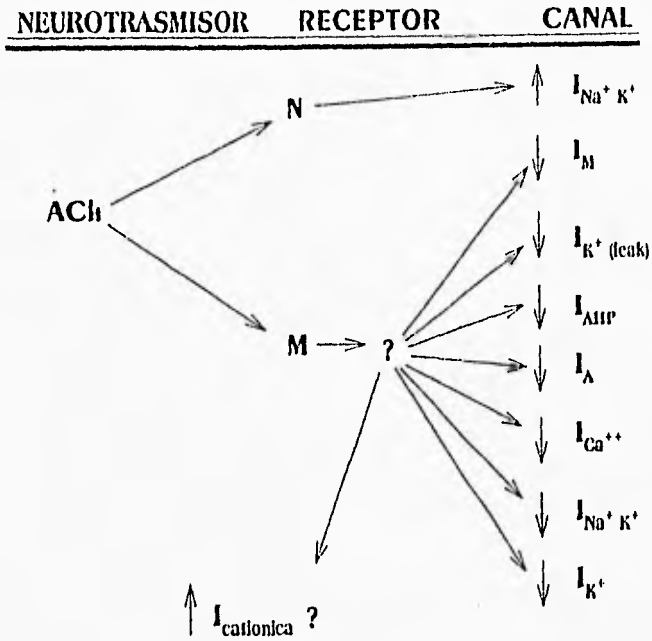


Figura 3. Divergencia de la acción de la acetilcolina (ACh) sobre sus receptores. La Ach presenta dos tipos de receptores (nicotínicos y muscarínicos), 1 acción nicotínica y 7 acciones muscarínicas (figura tomada de Nicoll et al, 1990).

## DISPARO NEURONAL

Las neuronas del sistema nervioso central pueden exhibir diferentes patrones de disparo endógenos (es decir que no dependen de los circuitos), algunas neuronas pueden ser silentes en ausencia de estímulos externos, mientras otras pueden disparar potenciales de acción espontáneamente y a intervalos regulares o irregulares. Las diferentes neuronas pueden también mostrar variaciones en la forma y duración de sus potenciales de acción, lo cual se ha correlacionado con la diferencia de conductancias que participan durante el potencial de acción. La duración del potencial de acción es importante para determinar la cantidad de neurotransmisor liberado de las terminales (Bargas et al., 1994).

En la figura 4 se muestran seis diferentes tipos neuronales con sus respectivos patrones de disparo particulares, los cuales reflejan a su vez las diferencias en sus conductancias iónicas.

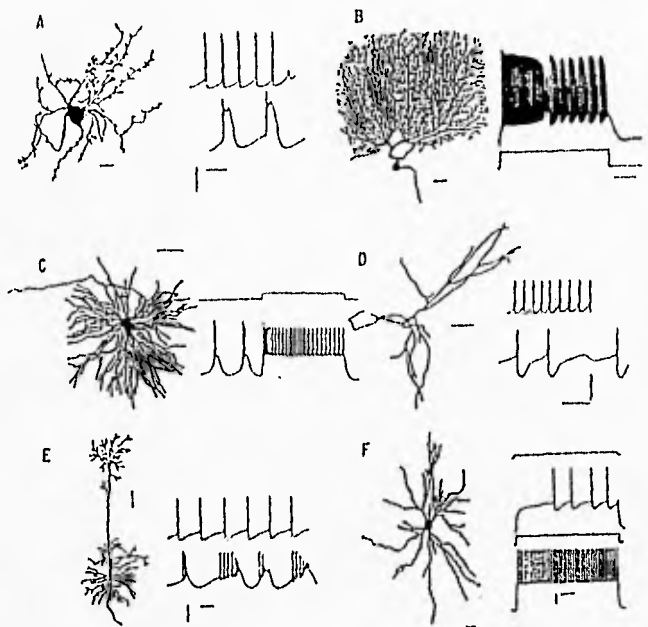


Figura 4. Diferencias neuronales, morfológicas y funcionales.

A. Neuronas de la oliva inferior, con disparos rítmicos. B. Células cerebelares de Purkinje, con disparos de espigas de calcio y sodio. C. Neuronas Talámicas, con disparo tónico y en ráfagas. D. Neuronas de la sustancia nigra compacta, con 3 disparos espontáneos. E. Neuronas Piramidales de la corteza. F. Principales neuronas del neostriado (Tomado de Bargas y Galarraga, 1995, en la figura original no se muestran las escalas).



Los patrones de actividad eléctrica neuronal no son estáticos, sino que están sujetos a la regulación dinámica por una variedad de influencias externas. Por ejemplo, bajo ciertas condiciones una neurona que normalmente es silente, puede empezar a disparar potenciales de acción de manera espontánea, la duración de estos potenciales de acción puede incrementarse o decrecer, o cambiar la frecuencia de disparo. (Levitan, 1994; Bargas y Galarraga, 1995; Bargas et al., 1993). Las propiedades de disparo de las neuronas son controladas por la interacción de muchos tipos de conductancias iónicas (Hille, 1984; Bargas y Galarraga, 1995).

Una corriente de K<sup>+</sup> fue parte de la descripción original del mecanismo de generación del potencial de acción en el axón gigante de calamar por Hodgkin y Huxley. Esta corriente mostró ser la responsable de la repolarización del potencial de acción (Rudy, 1988). Ahora se sabe que las neuronas poseen una extensa variedad de canales de potasio (K<sup>+</sup>) cinéticamente distintos, y la mayoría de estos pueden ser modificados (abiertos o cerrados) por la acción de neurotransmisores y hormonas que interactúan con los receptores membranales que a su vez se acoplan a proteínas G (Brown, 1990).

Las corrientes de K<sup>+</sup> juegan un papel clave en la determinación del curso temporal de potenciales de acción así como la trayectoria de voltaje interespigas durante el disparo repetitivo. Muchas de estas corrientes de K<sup>+</sup> son activadas por cambios en el potencial de membrana y algunos por la elevación del calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular (Hille, 1984). Las corrientes de K<sup>+</sup>

varían mucho en sus cinéticas, en su dependencia de voltaje, farmacología, conductancia de canal único y otras propiedades (Lancaster et al., 1991; Rudy, 1988). Frecuentemente se encuentran distintos tipos de corrientes de K' en la misma célula, demostrando que su diversidad no es estrictamente debida a diferencias entre tipos celulares. Además tipos similares de corrientes de K' pueden ser encontrarse en diferentes células.

En las neuronas casi todas las corrientes de K' son básicamente inhibitorias y juegan un importante papel en la regulación del nivel de excitabilidad neuronal.

El requerimiento de un gran repertorio de patrones de disparo en el sistema nervioso puede por lo tanto ser resultado de la diversidad de canales de K'. Los canales de K' tienen la capacidad de ser la base de diversos y ricos patrones de disparo neuronal y juegan un papel en la integración y codificación de información neuronal (Rudy, 1988). Además diversas observaciones han sugerido que los canales de K' (incluyendo los canales de K' dependientes de Ca<sup>2+</sup>) participan en el proceso de aprendizaje en invertebrados y vertebrados (Hinrichsen, 1993).

## EL POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE

En el disparo neuronal los potenciales de acción son seguidos por un postpotencial hiperpolarizante (PPH) que modula el disparo repetitivo (Blatz y Magleby, 1986; Pineda et al., 1992; Hernández-López et al., 1996), el cual usualmente se debe a la activación de corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , como consecuencia del influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular durante el potencial de acción (PA). Este influjo de calcio conduce a la activación de cuando menos 2 tipos de corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$  las que contribuyen a la generación del PPH y a la repolarización del PA en neuronas neocorticales (Pineda et al., 1992; Rudy, 1988; Hinrichsen, 1993). En neuronas neocorticales de mamífero la participación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  y los PAs de  $Ca^{2+}$  han sido estudiados (Bargas et al., 1991; Galarraga et al., 1989).

El PPH consta de dos o más componentes: unos rápidos seguido por uno o más componentes lentos (Sah y McLachlan, 1991). Esto varía de una neurona a otra. Por ejemplo: En células piramidales de hipocampo, el potencial de acción es seguido por tres diferentes posthiperpolarizaciones (PPHs): (1) Un PPH rápido (fAHP) con una duración de 2-5 ms, (2) un PPH medio (mAHP) con una duración de 50-100 ms, y (3) un PPH lento (sAHP) con una duración de más de 1s (Storm, 1987, 1989).

En contraste en el neocórtex el PPH consta de un componente rápido que dura unos pocos milisegundos y un componente lento que

dura aproximadamente 250 ms y que comprende la principal porción del PPH (Galarraga et al., 1989; Pineda et al., 1992), y es mejor observado después de un tren de PAS.

En células piramidales de hipocampo el PPH rápido y el PPH lento (pero no el PPH medio) son inhibidos en un medio libre de  $Ca^{2+}$  o por bloqueadores del canal de  $Ca^{2+}$  ( $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Cd^{2+}$ ), pero el TEA únicamente bloquea el PPH rápido y la noradrenalina únicamente el PPH lento, esto sugiere que dos corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$  están involucradas en el PPH: Una rápida, sensible al TEA ( $I_C$ ) la cual es la base del PPH rápido y una lenta sensible a la noradrenalina ( $I_{NIF}$ ) que es la base del PPH lento (Storm, 1987).

En general durante el PPH de distintos tipos neuronales participan diferentes tipos de corrientes, las cuales pertenecen a las corrientes salientes de inactivación lenta o persistentes; dichas corrientes salientes se oponen a estímulos despolarizantes y a corrientes entrantes, además, reducen la excitabilidad por aumento del umbral de disparo.

Las corrientes salientes están asociadas con una prolongada posthíperpolarización y una gran adaptación de la frecuencia de disparo.

Dentro de estas corrientes salientes de inactivación lenta se encuentran:

1. Los rectificadores retardados ( $I_K$ ) dependientes de voltaje, los cuales son sensibles al TEA.

2. La corriente (BK) de K<sup>+</sup> activada por voltaje y [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, (I<sub>C</sub>), que es sensible al TEA, CTX y NTX. Además está asociada con el PPH rápido y en algunas neuronas contribuyen a la repolarización del potencial de acción (Storm, 1987; Lancaster y Nicoll, 1987).

3. Las corrientes (SK) de K<sup>+</sup> activadas por [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, I<sub>SK</sub> son sensibles al TEA, algunas son sensibles a la apamina (Blatz y Magleby, 1987; Lancaster et al., 1991; Rudy, 1988; Kolb, 1990; Dreyer, 1990), a la D-tubocurarina y posiblemente a la caribdotoxina (CTX) y es la base del PPH lento. Además la I<sub>SK</sub> puede ser bloqueada por una inyección de BAPTA (quelante) y por la aplicación de 8 bromo-cAMP (Blitzer et al., 1994).

4. La corriente M, I<sub>M</sub> es una corriente de K<sup>+</sup> sensible al voltaje, muscarina, substancia P, LHRH, somatostatina y otras sustancias, además también depende de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Bargas et al., 1993; Rudy, 1988), esta corriente es importante para el intervalo interespigas durante el disparo repetitivo, al menos cuando la I<sub>C</sub> y la I<sub>SK</sub> han sido bloqueados (Storm, 1989).

Una función típica de todas estas corrientes salientes lentas es la posthiperpolarización (PPH) que sigue a una espiga. Por ejemplo, el PPH que sigue a una sola o a múltiples espigas en las neuronas del neocórtex es debido en parte, a la corriente saliente dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Galarraga et al., 1989; Pineda et al., 1992). Además de corrientes salientes persistentes durante el PPH también participan conductancias de potasio transitorias (I<sub>A</sub>) que son también llamadas de inactivación rápida cuyos canales (canales A) tienen como función, prolongar las latencias

del disparo, mantener las frecuencias bajas de disparo, producir disparos rítmicos, repolarizar los potenciales de acción y espigas despolarizantes y estabilización del potencial de membrana. Muchas de estas corrientes son sensibles a la 4-AP, algunas son sensibles al TEA y algunas son sensibles a  $[Ca^{2+}]_i$ , (Bargas et al., 1993; Storm, 1987). Tanto los rectificadores retardados como la corriente A son canales voltaje dependientes (Rudy, 1988).

En el neostriado las variaciones en la participación de las  $gK_{Ca}$  y las conductancias dependientes del voltaje, en diferentes potenciales de membrana determina los cambios que se observan en las características del PA y del disparo repetitivo en estas neuronas, por ejemplo, la participación de las conductancias transitorias dependientes del voltaje aumenta a potenciales hiperpolarizados provocando que la velocidad de la repolarización del PA y la latencia en el inicio del disparo, aumente en estos potenciales de membrana, mientras que el incremento de las  $gK_{Ca}$  determina la frecuencia de disparo (Pineda et al., 1995).

Los efectos del  $Cd^{2+}$  sobre el PA y el PPH sugieren, la participación de  $gCa^{2+}$  de alto umbral de activación en estos eventos (Galarraga et al., 1994; Pineda et al., 1992). La reducción que produce en la velocidad de la repolarización del PA y en la amplitud del PPH, sugiere que el  $Ca^{2+}$  participa en la generación de ambos eventos (Bargas et al., 1994) activando una o más  $gK_{Ca}$  (Pineda et al., 1992). Los efectos de la apamina y la caribdotoxina sobre el PA y el PPH, indican que las neuronas

neostriatales poseen al menos dos diferentes  $gK_{cs}$ . (Pineda et al., 1992) las que usan canales de baja conductancia (<20pS) conocidos como "SK" y las que usan canales de conductancia grande (>100pS) conocidos como "BK". Los primeros sensibles al péptido apamina (Blatz y Magleby, 1987) y los segundos sensibles al péptido caribdotoxina (Miller et al., 1985).

La  $gK_c$ , sensible a la caribdotoxina también es sensible al voltaje (Miller et al., 1985) se activa rápidamente y se ha encontrado que participa en la repolarización del PA en diferentes tipos neuronales, se le conoce como  $I_c$  (Sah y McLachlan, 1992; Storm, 1987; Pineda et al., 1992).

Por último, se ha mostrado que en el PA y el PPH así como, durante el disparo repetitivo en las neuronas neostriatales participan conductancias transitorias dependientes del voltaje y al menos, dos diferentes  $gK_{cs}$ , las cuales contribuyen diferencialmente a su generación. Estos eventos son modulados por el agonista colinérgico carbacol (Pineda, 1995).

#### **DIFERENCIAS ENTRE LOS POTENCIALES DE ACCION DE UN TREN PROVOCADOS POR UN PULSO CUADRADO DE CORRIENTE**

En un tren de PAs, los PA evocados difieren durante el curso de tiempo que dura el pulso de estimulación mostrándose así que los PAs iniciales son ligeramente menos anchos donde la fase rápida es relativamente más pronunciada y su PPH es menor, por lo cual las  $I_k$ ,  $I_c$  y la  $I_A$  (corriente de inactivación lenta) son las

corrientes predominantes. En cambio los PAS finales son ligeramente más anchos con respecto a los primeros y su PPH es más grande, es decir la fase lenta predomina, haciéndose más evidente la participación de la  $I_{AMP}$  (corriente persistente) responsable del PPH lento; en estos la fase rápida no es clara.

Esto nos muestra un posible efecto acumulativo dado como consecuencia de la entrada progresiva de  $Ca^{2+}$  durante el tren de espigas, favoreciéndose de esta manera las corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , como es el caso de la  $I_c$ ,  $I_{AMP}$  y la  $I_A$ , de las cuales la  $I_c$  y la  $I_{AMP}$  son corrientes persistentes o de inactivación lenta, en cambio la  $I_A$  es una corriente transitoria es decir se inactiva rápidamente, lo cual se ve reflejado en su pobre participación en las últimas espigas de un tren de PAS (Pineda et al., 1992, figura 5).



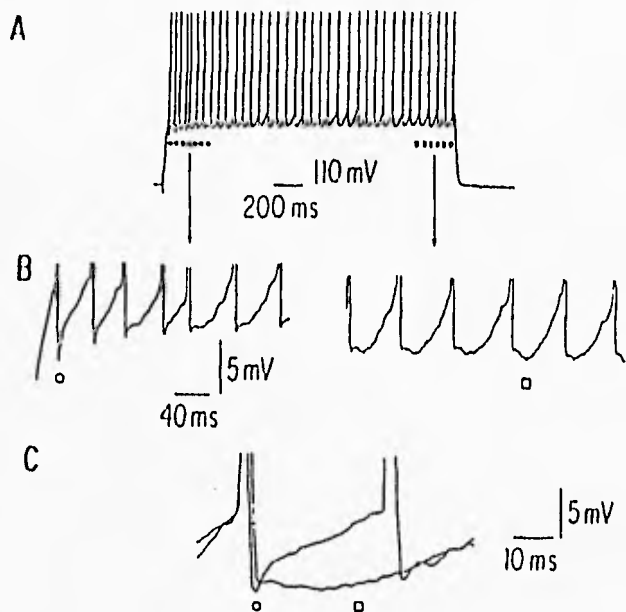


Figura 5. Diferencias entre los potenciales de acción de un tren de PAs. A. Tren de PAs evocados por un pulso de corriente depolarizante (0.45 nA, no mostrado). B: primeras (círculo) y últimas (cuadrado) trayectorias interespigas del tren. C: PAs junto con su PPH sobrepuestos (primera, círculo y última, cuadrado). Potenciales truncados. Note el ensanchamiento de la espiga y el cambio en la trayectoria del PPH (Pineda et al., 1992).

## NEUROMODULACION

La modulación de las propiedades de los canales iónicos de membrana es de fundamental importancia para la regulación de la actividad eléctrica neuronal y funciones neuronales superiores (Levitan, 1994). La neuromodulación generalmente actúa a través de proteínas G y otros caminos de señales intracelulares que continuamente reconfiguran las respuestas neuronales por reducción o incremento de las conductancias iónicas (Bargas y Galarraga, 1995).

Los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> son frecuentemente los blancos de modulación por neurotransmisores y pueden ser regulados por la acción de segundos mensajeros que pueden estimular a la cinasa C y a las calmodulin cinasas. Estas enzimas pueden modificar la función del canal, cambiando así la excitabilidad neuronal (Rudy, 1988). Por ejemplo, existe una participación específica de la calmodulina dependiente de la proteína cinasa II (CaMKII) en la reducción muscarínica de la adaptación y el PPH lento en neuronas de CA1 y CA3 en hipocampo.

Dado que la adaptación y el PPH lento son debidos a la activación de canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> en estas células, es razonable sugerir que estos canales pueden ser los substratos relevantes de (CaMKII) y la modulación colinérgica (Muller et al., 1992; Rudy, 1988).

Como ya se mencionó, estas corrientes (K<sup>+</sup> activadas por Ca<sup>2+</sup>) son importantes en la regulación de la frecuencia de disparo y si

se acumula  $Ca^{2+}$  durante el disparo repetitivo pueden regular la adaptación de la frecuencia de disparo. En general la  $I_{AHP}$  puede ser modulada por varias sustancias como, la noradrenalina, acetilcolina, serotonina, histamina, dopamina, carbacol, 8-bromo cAMP, sustancia P, adenosina entre otras, en diversos tipos neuronales (Madison y Nicoll, 1984; Storm, 1987; Lancaster y Nicoll, 1987; Blitzler et al., 1994; Pedarzani y Storm, 1993).

En las neuronas de hipocampo la dopamina incrementa la excitabilidad por supresión de la corriente  $I_{AHP}$  de  $K^+$  activada por bajo  $Ca^{2+}$ , este efecto es mediado por PKA dependiente de cAMP. La dopamina no activa receptores vía  $\beta$ -adrenérgica, además ejerce un efecto excitatorio similar al producido por otras monoaminas (norepinefrina, serotonina, histamina). La norepinefrina, el carbacol y la dopamina bloquean el PPH lento y afectan la duración de las espigas, lo cual previene la adaptación de disparo durante el tren (Madison y Nicoll, 1986).

Estos efectos involucran diferentes cadenas de señalización intracelular que inciden sobre la misma conductancia, la  $I_{AHP}$ .

En particular agonistas colinérgicos muscarínicos deprimen el PPH ( $I_{AHP}$ ) en neuronas de proyección neocortical e incrementan la frecuencia de disparo, esta acción es probablemente mediada a través de la proteína cinasa C (Tarsy, 1979), en cambio el agonista D1 a dopamina aumenta en las mismas células el PPH, explicando parcialmente el decremento en la frecuencia de disparo inducida por dopamina, esta acción es probablemente mediada por un incremento en el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$ .

tipo L, también puede ser en parte mediada a través de PKA así como análogos de cAMP los cuales imitan la acción dopaminérgica.

La acción de D1 es inhibida en presencia de BayK 8644 (agonista de la corriente de calcio) pero no en presencia de TEA (un bloqueador de la corriente de K'), sin embargo los agonistas del receptor D1 a dopamina aumentan los efectos del TEA. Esto sugiere que el agonista a D1 y BayK actúan sobre el mismo blanco: canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L y que la acción del agonista D1 sobre el PPH no es principalmente mediada por conductancias de K', lo cual probablemente está asociado con otras acciones de la dopamina, tales como una reducción de la corriente interna de Na<sup>+</sup>. (Hernández-López et al., 1996; Tarsy, 1979). En la figura 6 se muestra la convergencia de la acción de varios receptores de neurotransmisores sobre un tipo de canal iónico, un canal de K' activado por Ca<sup>2+</sup> (I<sub>AHP</sub>), todos los neurotransmisores enlistados actúan en las células piramidales hipocámpales y convergen sobre la misma conductancia de K' (I<sub>AHP</sub>, Nicoll et al., 1990).

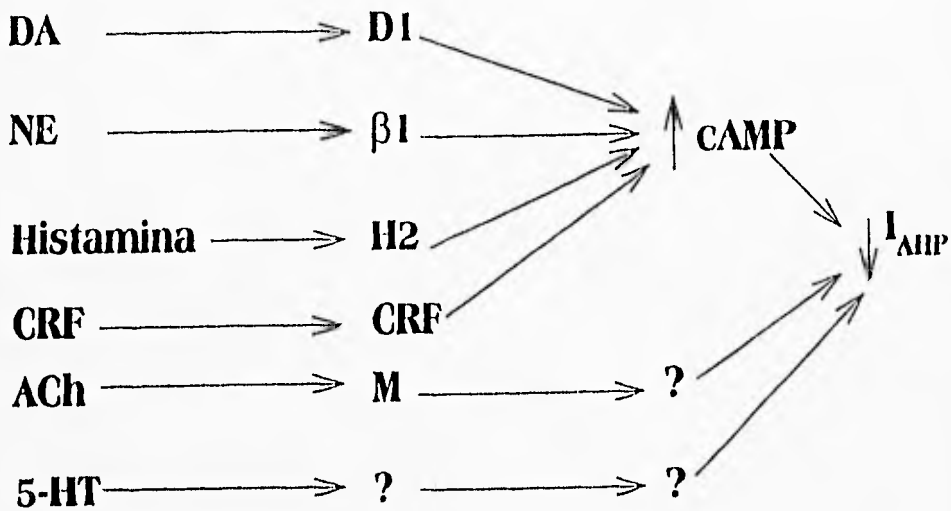


Figura 6. Convergencia de receptores a neurotransmisores sobre el mismo canal iónico. Convergencia sobre una corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$  responsable de la posthiperpolarización ( $I_{AHP}$ , Nicoll et al., 1990).

Existe una relación antagónica importante entre los mecanismos de DA y ACh en el neostriado, ya que la interacción DA-ACh neostriatal sugiere que las neuronas estriatales colinérgicas con propiedades excitatorias reciben una inhibición directa de entrada dopaminérgica de la sustancia nigra. La reducción de la actividad dopaminérgica resulta en un incremento de la actividad colinérgica, mientras que un incremento de la actividad dopaminérgica resulta en la inhibición de la actividad colinérgica estriatal, así tenemos a una población de neuronas colinérgicas estriatales bajo la influencia directa de una entrada dopaminérgica inhibitoria tónica (Tarsy, 1979; Bargas y Galarraga, 1995; Nicoll et al., 1990).

Registros intracelulares han revelado que el efecto postsináptico primario de agonistas colinérgicos en neuronas neostriatales es un incremento en la resistencia de entrada y en la respuesta de disparo, en contraste el principal efecto postsináptico de agonistas dopaminérgicos es un decremento en la respuesta de disparo y en la resistencia de entrada (ver figura 7, Bargas y Galarraga, 1995). En el lado izquierdo el agonista colinérgico carbacol ( $10\mu\text{M}$ ) incrementó la frecuencia de disparo con el mismo estímulo de rampa. En el lado derecho la dopamina ( $10\mu\text{M}$ ) produjo un efecto opuesto (Bargas y Galarraga, 1995).

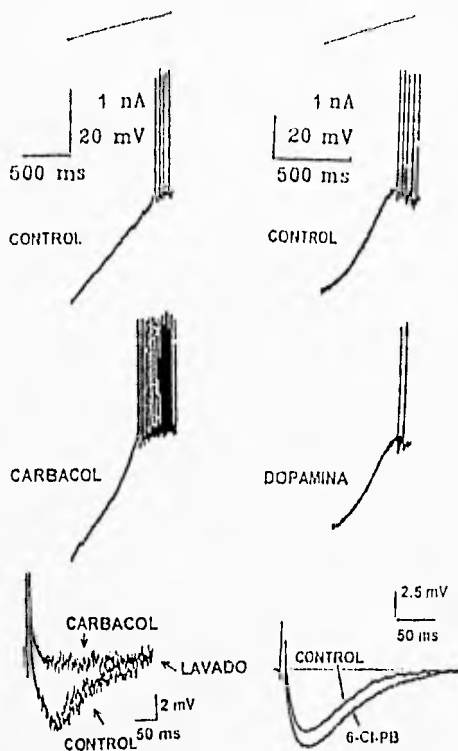


Figura 7. Comparación de la acción dopaminérgica y colinérgica en los patrones de disparo y el PPH que sigue a un tren de PAs, en las neuronas espinosas medianas.

Arriba, corriente de estimulación aplicada. En el lado izquierdo, incremento en la frecuencia de disparo producido por el agonista colinérgico carbacol ( $10\mu\text{M}$ ), así como la reducción del PPH que sigue a un tren de PAs; en el lado derecho, disminución de la frecuencia de disparo producido por dopamina ( $10\mu\text{M}$ ) y aumento del PPH que sigue a un tren de PAs provocado por el agonista dopaminérgico 6-Cl-PB. (figura tomada de Bargas y Galarraga, 1995).

Como se mencionó anteriormente la  $I_{AHP}$  puede ser modulada por varias sustancias entre las cuales se encuentra el carbacol (CCh), el cual además de reducir el PPH, despolariza a las neuronas e incrementa la frecuencia de disparo y la resistencia de entrada manteniendo el mismo estímulo, tal cambio es reversible en aproximadamente 15 minutos de lavado. Cuando el CCh es administrado en presencia de atropina, este no es capaz de reducir la posthiperpolarización, lo cual sugiere que esta modulación es mediada por receptores muscarínicos del tipo M1 (Nicoll et al., 1990; Muller y Connor, 1991; Hass, 1982; Dood et al., 1981; Wolfgang y Connor, 1991; Pineda et al., 1992, 1995; Galarraga et al., 1989; Bargas y Galarraga, 1995).

Así se sabe que en el neostriado la ACh modula el PPH que sigue a un sólo PA a través del receptor muscarínico del tipo M1 (Bargas y Galarraga, 1995; Pineda et al., 1995).

En la figura 8 se muestra el efecto del carbacol sobre el postpotencial-hiperpolarizante (PPH) después de un solo potencial de acción en una neurona de neostriado (A), y también se muestra el bloqueo de los efectos del carbacol por atropina en el PPH (B, Pineda et al., 1995).



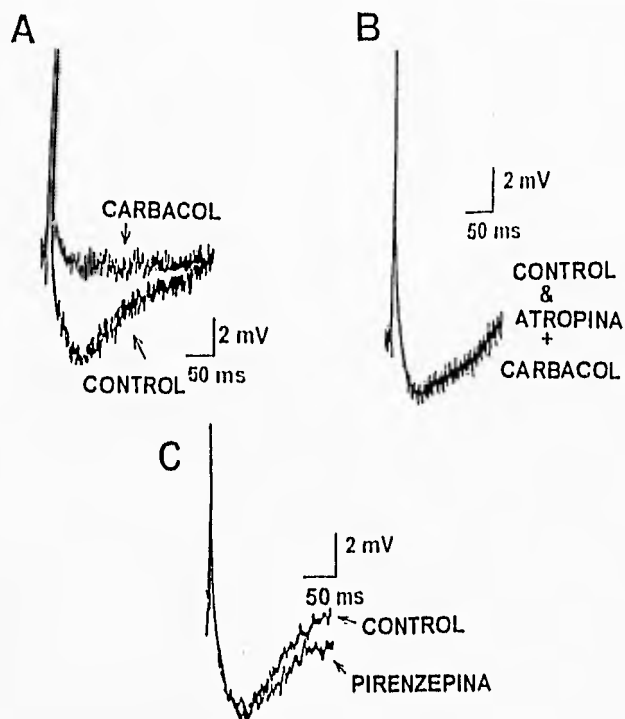


Figura 8. Disminución de la amplitud y la duración del PPH producido por carbaccol (A) y bloqueo del efecto del carbaccol sobre el PPH por la aplicación de atropina (B) en las neuronas neocorticales. En C se muestra la superposición de los postpotenciales en condiciones control y en presencia de pirenzepina (Tomado de Pineda, 1995).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si el PPH que sigue a un sólo PA es modulado por el agonista colinérgico carbacol y en tal evento existe la participación de conductancias de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$ , entonces el PPH que sigue a un tren de PAs debe de ser igualmente modulado por el carbacol, aunque quizás las conductancias participantes en el PPH post tren no sean las mismas, pues los intervalos entre espigas provocados difieren en función del tiempo que dura la estimulación. Además los PAs finales son más prolongados que los PAs del inicio del pulso.

## OBJETIVOS

Determinar si existe un efecto modulador de la acetilcolina sobre el PPH que sigue al disparo repetitivo de las neuronas espinosas medianas del neostriado de la rata, utilizando para ello el agonista colinérgico carbacol.

Dar evidencia de cuales conductancias de  $K^+$  participan en el PPH que sigue al tren de PAs, mediante el uso de bloqueadores selectivos.

## MÉTODO

Los experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro de rata mantenidas *in vitro*. En esta preparación, se llevaron a cabo registros intracelulares en neuronas del núcleo neoestriado. Para obtener las rebanadas se utilizaron cerebros de ratas Wistar con un peso de entre 100 y 200 g.

Al inicio de cada experimento, las ratas fueron anestesiadas con éter y después decapitadas.

Para poder remover el cerebro se seccionó el hueso occipital en 2 regiones a partir del agujero occipital, se continuó sobre la sutura biparietal para separar los huesos parietales y se continuó hasta separar a la mitad el hueso frontal, por último se cortó a nivel de la escotadura nasal.

Una vez descubierto el cerebro fue completamente removido desde su base con la ayuda de una espátula y fue sumergido en una solución fisiológica (Krebs) de la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, y 11 glucosa, 35.22 mg de 1-ascorbato y 15.22 mg de tio-urea con un pH de 7.4, la solución fue constantemente burbujeada con una mezcla CO<sub>2</sub> 5% y O<sub>2</sub> 95% (carbógeno) mantenida a una temperatura de aproximadamente 4 grados centígrados durante unos cuantos segundos, para lo cual se utilizó hielo. Enseguida se colocó el cerebro sobre una caja de Petri fría recubierta con papel filtro para proceder a

cortarlo. Se quitaron el cerebelo, el bulbo raquídeo y el bulbo olfatorio, finalmente se separaron ambos hemisferios, de tal manera que se obtuvieron 2 bloques.

Posteriormente estos bloques fueron pegados con cianoacrilato en una cámara de cristal dentro de un vibratomo Pelco serie 1000.

La cámara fue llenada con solución Krebs y se burbujeó con carbógeno constantemente. Se obtuvieron rebanadas sagitales de cerebro de 400  $\mu\text{m}$  de espesor que contenían al núcleo estriado, (a partir de este momento nunca se dejaron de burbujear las rebanadas de cerebro).

Las rebanadas obtenidas se depositaron en un vaso de precipitado con solución Krebs a temperatura ambiente (15 a 20°C).

Dichas rebanadas se dejaron reposar aproximadamente 30 minutos antes de comenzar el registro intracelular.

#### **REGISTRO INTRACELULAR**

Para iniciar el registro intracelular se trasladó una rebanada de cerebro a la cámara de registro donde fue sujeta entre 2 redes de nylon. La cámara fue constantemente bañada con solución Krebs, y mantenida a una temperatura entre 32 y 35 °C. En esta cámara el microelectrodo se encontraba acoplado a un amplificador (*Neuro Data*, modelo IR-183) que se encargaba de registrar la señal, dicha señal es transmitida a un osciloscopio (*Nicolet 310*) en donde se observo. El registro continuo de un

experimento se almacena en cintas de video. Este sistema se esquematiza en la figura 9.

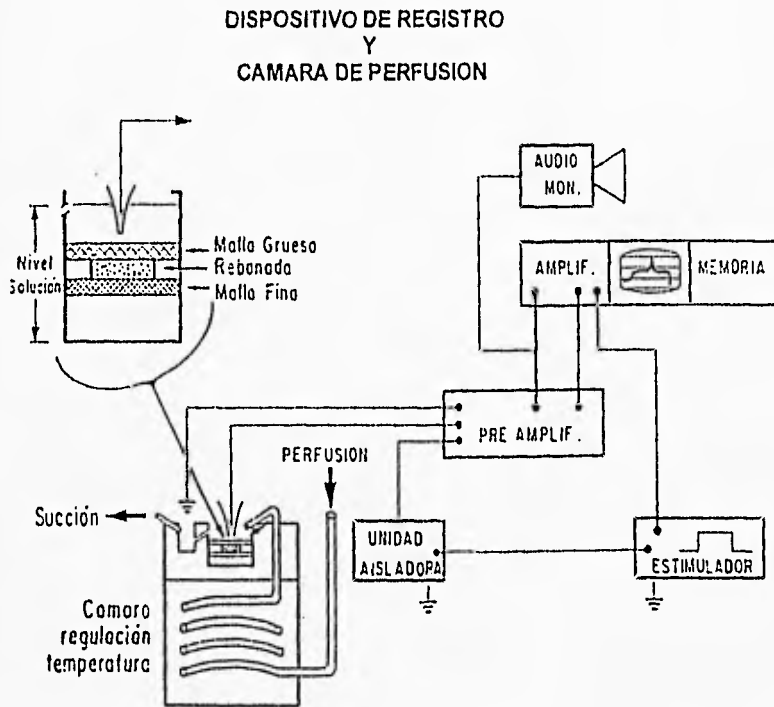


Figura 9. Esquema del dispositivo experimental para registro intracelular.

Los microelectrodos utilizados para el registro fueron hechos con capilares de borosilicato *FHC Brunswick* en un estirador de pipetas *Brown / Flaming* modelo P-87 de *Sutter Instruments*.

Todos los microelectrodos fueron llenados con una solución de acetato de potasio 3 M, y en algunos casos se añadió biocitina al 1% (*Sigma*), para poder marcar intracelularmente las neuronas que se registraron (ver figura 10). Para ello se siguió el método descrito por *Horikawa y Armstrong (1988)*. La resistencia de los electrodos se encontró en un rango de entre 80 y 120 M $\Omega$ .

Para obtener los registros se colocó la punta del microelectrodo en la superficie de la rebanada justo por encima del neocortico, después se aplicó un pulso rectangular de corriente a través del microelectrodo, se compensó su capacidad y se balanceó el puente producido por el pulso. Después se hizo descender el microelectrodo mediante un micromanipulador.

Conforme se descendía se iban aplicando pulsos rectangulares de corriente observando el momento de un cambio en el potencial de membrana; indicio de que se penetró a una neurona: el potencial se vuelve negativo y se producen potenciales de acción espontáneos o como resultado de la inyección de corriente depolarizante. Los potenciales de membrana obtenidos se encontraron entre -80 y -85 mV. Los fármacos fueron aplicados a concentraciones conocidas directamente a la solución Krebs que bañaba a la rebanada de cerebro. Estos fueron: 4 amino-piridina (4-AP), cloruro de tetra-etil-amonio (TEA), cloruro de carbamilcolina (carbacol) y apamina (*Sigma*). Los registros fueron

digitalizados y almacenados en cintas de video (VHS), que posteriormente fueron procesados en una computadora PC 486, con la ayuda del programa LAB-VIEW (National Instruments). Con los programas Sigma Plot y Origin se generaron gráficas de corriente contra voltaje (I/V), intensidad contra frecuencia, etc.

Los protocolos experimentales realizados fueron los siguientes:

#### **PROTOCOLO NÚMERO 1**

Una vez hecho el empale, la célula, se mantuvo en su potencial de membrana que en promedio fue de -85 mV.

Se inyectó corriente (pulsos cuadrados de aproximadamente 325 ms de duración) de diferente intensidad tanto depolarizantes como hiperpolarizantes, para obtener el registro del respectivo cambio de voltaje.

La intensidad se incrementó hasta alcanzar el umbral de disparo en la célula.

Con los valores de corriente aplicada y los voltajes obtenidos se realizó la gráfica de la función de corriente contra voltaje.

Este protocolo se realizó tanto en condiciones control como en presencia de las drogas en la misma neurona.

#### **PROTOCOLO NÚMERO 2**

Se llevó a la célula a un potencial de mantenimiento de -60 mV (a través de la inyección de corriente directa) y se aplicó un

pulso de corriente depolarizante que provocó aproximadamente entre 7 y 9 potenciales de acción y un postpotencial hiperpolarizante (al finalizar el pulso).

Se tomaron registros en condiciones control, y después se aplicaron las drogas a concentraciones conocidas para estudiar los efectos sobre el postpotencial hiperpolarizante y la frecuencia de disparo y se tomaron registros en ambas condiciones.

La corriente aplicada permaneció constante durante todo el experimento. Nunca se mueve la corriente para que nuestros registros sean comparables, así como el potencial de mantenimiento (-60 mV). Se deben conservar el potencial de mantenimiento y el puente balanceado.

Los pulsos de corriente se aplicaron a una frecuencia de 0.2 Hz por minuto). El registro se debe realizar a frecuencias bajas.

#### **REGISTRO DE FIJACION DE VOLTAJE**

En paralelo a estos experimentos se realizaron estudios de registro extracelular en neuronas de neocórtex.

El procedimiento para este tipo de registros es el siguiente:

Se disecciona el núcleo caudado de las rebanadas de cerebro de rata, las cuales se obtuvieron de la misma forma que se obtuvieron para el análisis de registro intracelular.

Una vez diseccionados los núcleos fueron incubados en 30 ml de solución Krebs adicionada con 1 mg/ml de pronasa EXIV (Sigma) durante 20 minutos. Después las rebanadas fueron trasladadas a un



tubo de ensayo en donde la enzima fue lavada tres veces con una solución fisiológica con bajo contenido de calcio y amortiguada con HEPES (soluciones, ver Pineda, 1995). Posteriormente en esta misma solución los núcleos se hicieron pasar por 3 pipetas Pasteur biseladas con diámetros progresivamente menores. En cada paso se dejaron sedimentar en un tubo de ensayo y se colectó el sobrenadante en otro tubo.

El sobrenadante recolectado se depositó en una caja de Petri, la cual se colocó en el campo visual de un microscopio invertido *Nikon* en donde se dejó reposar durante 5 minutos en una solución fisiológica amortiguada con HEPES y con  $Ca^{2+}$  normal.

Después de esto se aplicó un flujo muy lento con la solución fisiológica con  $Ca^{2+}$ .

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron mediante microelectrodos con una resistencia de entre 3-7  $M\Omega$  y se llenaron con alguna de las soluciones intracelulares. Los sellos se consideraban exitosos cuando alcanzaban una resistencia mayor a 1  $G\Omega$ .

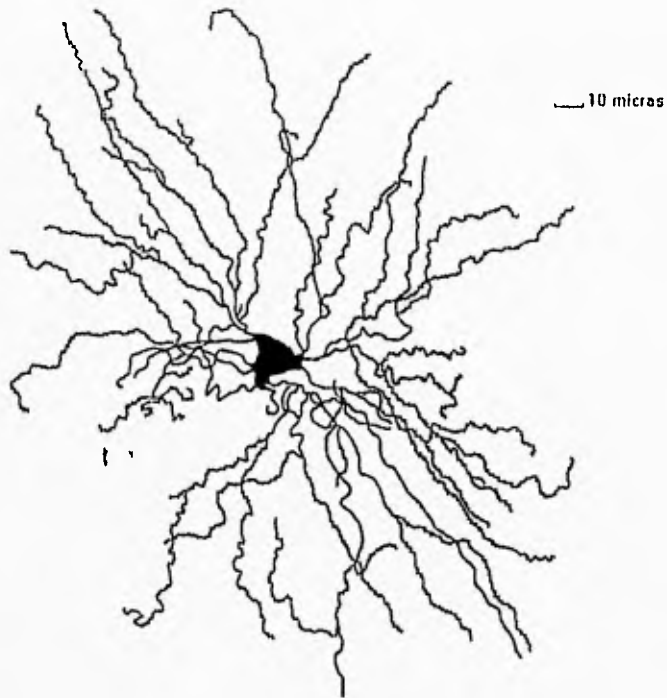


Figura 10. Esquema que muestra la reconstrucción serial de una neurona espinosa mediana del neocórtex (Reconstruida en el laboratorio de la Dra. Elvira Galarraga, IFC, UNAM). Durante el experimento fue llenada con biocitina (1%) a través del electrodo de registro y fue revelada por el método de diaminobenzidina. Estas neuronas se caracterizan por presentar un gran número de espinas sobre sus dendritas. Su soma presenta un diámetro de entre 12-20  $\mu\text{m}$ . Generalmente presentan de 25-30 ramas dendríticas (Wilson, 1990).

## RESULTADOS

Para poder estudiar la neuromodulación por acetilcolina del postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un tren de potenciales de acción, se realizaron registros intracelulares en 22 células de neocóstriado de cerebro de rata, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

### CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DEL NEOCÓSTRIADO

En la figura 11 se muestra el registro electrofisiológico de una neurona de neocóstriado en la cual se siguió el protocolo número 1 (ver métodos).

En esta figura se muestra en la parte superior, los pulsos de corriente a diferentes intensidades que fueron aplicados a través del electrodo de registro. Los pulsos despolarizantes se muestran hacia arriba y los hiperpolarizantes hacia abajo. En la parte inferior de esta figura se muestran los registros de voltaje en respuesta a la corriente inyectada. Los pulsos de corriente despolarizante se incrementaron hasta alcanzar el umbral de disparo, (el cual se encuentra alrededor de  $-45$  mV). Se observa que estas neuronas presentan un periodo de latencia antes del disparo del primer potencial de acción; esto se debe a que los potenciales de acción son precedidos por una despolarización lenta en forma de rampa.

También se puede observar que a intensidades similares para los pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes, la respuesta de voltaje obtenida no es simétrica, es decir, hay rectificación, ya que para los pulsos despolarizantes la respuesta de voltaje muestra una mayor amplitud.

En el lado derecho de la figura se muestra la gráfica de la relación de voltaje contra corriente, observese que la relación no es lineal. En esta neurona el potencial de reposo fué de -87 mV y la resistencia fue de  $-58.8 \text{ M}\Omega$ , la cual se obtuvo mediante un ajuste polinomial en la gráfica de I vs V. El potencial de reposo promedio de las células registradas fue de  $-85.31 \text{ mV} \pm 2.89$  (n=16) y la resistencia promedio fue de  $49.70 \text{ M}\Omega \pm 15.33$  (n=10) (ver tabla 1).

PM (mV)	RN (m $\Omega$ )
1. -87.00	1. 47.04
2. -87.00	2. 55.38
3. -87.00	3. 45.81
4. -86.00	4. 32.79
5. -85.00	5. 68.87
6. -87.00	6. 47.76
7. -85.00	7. 64.43
8. -86.00	8. 59.06
9. -89.00	9. 55.22
10. -88.00	10. 17.64
11. -85.00	
12. -86.00	PROMEDIO= 49.70
13. -85.00	
14. -80.00	
15. -80.00	
16. -80.00	
PROMEDIO= -85.31	

Tabla 1. Promedios de los potenciales de membrana (n=16), así como las resistencias de membrana (n=10) de los registros de las neuronas espinosas medianas obtenidas en condiciones control.

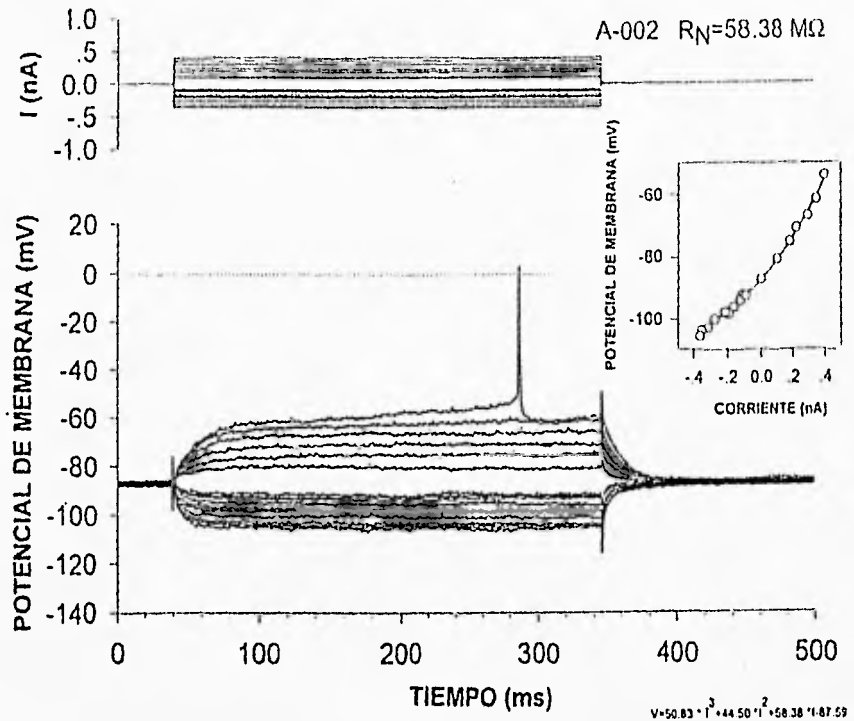


Figura 11. Registro elctrofisiológico de una neurona espinosa.

En la parte superior de la figura se muestran los pulsos rectangulares de corriente que fueron aplicados a la neurona (despolarizantes hacia arriba e hiperpolarizantes hacia abajo). En la gráfica inferior se muestra los cambios en el voltaje producidos en respuesta a los pulsos de corriente aplicada. La gráfica de la derecha muestra la función voltaje contra corriente.

\* polinomio ajustado.

En la figura 12 se muestran los registros electrofisiológicos en respuesta a pulsos de corriente despolarizante de diferente intensidad supraumbral (A-D). La duración del pulso de corriente fue la misma en todos los casos (281 ms). Debajo de cada pulso se muestra el disparo obtenido por la aplicación del pulso cuadrado de corriente despolarizante. Al aumentar ligeramente la intensidad de la corriente aplicada se nota un claro aumento en el número de potenciales de acción y una reducción del periodo de latencia para la primera espiga. Así mismo, se ve una reducción de los intervalos interespigas.

En la figura 12 C se puede observar que el incremento en el pulso de corriente provoca la pérdida, casi por completo, del periodo de latencia. Además se puede apreciar una ligera diferencia en cuanto a tamaño y duración de los intervalos interespigas iniciales con respecto a los últimos, notándose que los últimos presentan una mayor intervalo interespigas que los primeros. Esto sugiere cierta adaptación de la frecuencia de disparo y por lo tanto el desarrollo de conductancias lentas.

En la figura 12 D, la intensidad del pulso de corriente aplicada, dió como resultado la pérdida completa del periodo de latencia y un gran aumento del disparo repetitivo (comparado con los registros anteriores). En este último registro puede verse más claramente que el intervalo de tiempo entre los primeros potenciales de acción es menor. Es decir, la frecuencia de disparo es mayor al iniciar el pulso a pesar de que la intensidad de la corriente se mantiene igual durante todo el pulso (adaptación de la frecuencia de disparo).

En la figura 12 E se muestra una gráfica de tiempo vs el número de espigas de los cuatro trazos anteriores (A-D), en ella se pueden cuantificar los fenómenos descritos anteriormente.

Es decir: Se observa que a una menor intensidad de corriente (A) el tiempo que tarda en aparecer el primer potencial de acción es mayor, así también se ve reflejado el aumento en el número de potenciales de acción al incrementar la corriente aplicada.

Note que a altas intensidades de corriente aplicada las curvas se hacen menos lineales lo cual refleja aumento en la adaptación del disparo. Note que la derivada de estas curvas nos proporcionará la frecuencia instantánea de disparo. En 12 A, B esta frecuencia es constante luego el disparo es tónico. En 12 C, D la frecuencia disminuye con el tiempo, luego la frecuencia adquiere cierta adaptación.

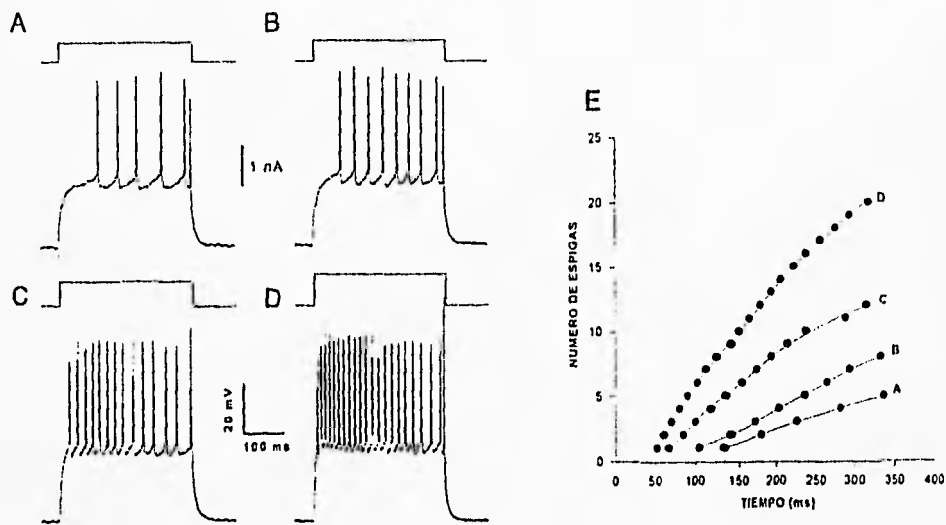


Figura 12. Respuesta neuronal a diferentes pulsos de corriente despolarizante. Trenes de potenciales de acción en una misma célula evocados por la aplicación de diferentes pulsos de corriente: 0.52 nA, 0.56 nA, 0.69 nA y 0.88 nA (A, B, C, y D, respectivamente). La duración del pulso fue de 281 ms. Gráfica de relación de tiempo vs número de espigas (E).



## EFEECTO DEL CARBACOL SOBRE LA RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE (I/V).

En la figura 13 se muestran registros de una misma célula en condiciones control (A) y después de haberle aplicado el agonista colinérgico carbacol a una concentración de 1  $\mu$ M (B).

La célula presentó un potencial de reposo de -87 mV.

En A se muestra en la parte superior los trazos que corresponden a los pulsos de corriente aplicada, tanto despolarizantes (hacia arriba) como hiperpolarizantes (hacia abajo), en la parte de abajo se muestra la respuesta de voltaje a los pulsos de corriente aplicada.

En B de igual manera que en las condiciones control se muestra en la parte superior los trazos correspondientes a los pulsos de corriente aplicada en presencia del agonista colinérgico carbacol y abajo la respuesta obtenida en el voltaje a la aplicación de tales pulsos de corriente.

Se realizó el protocolo de la curva I/V hasta alcanzar el umbral de disparo, tanto en condiciones control como en presencia de carbacol, y en ambas condiciones se puede observar el trazo de voltaje correspondiente al momento en que la célula alcanzó su umbral de disparo. Note que la intensidad de corriente necesaria para alcanzar desplazamientos equivalentes en el voltaje es menor en presencia de carbacol lo cual indica un incremento en la resistencia neuronal ( $V=RI$ )  $R=V/I$ . En la figura C se muestra la relación de I vs V, donde la resistencia de entrada en condiciones control fué de  $49.7 \text{ M}\Omega \pm 15.33$  (n=10) y en presencia

de carbacol hubo un aumento alcanzando  $70.07 \text{ M}\Omega \pm 12.45$  ( $n=4$ ). Ninguna de las dos relaciones es lineal, no obstante, se observa un claro aumento de la pendiente en presencia de carbacol. Estos valores se obtuvieron mediante un ajuste polinomial de 3er orden. El valor de resistencia de entrada reportado corresponde a la derivada en  $I=0$ . Note que las curvas se cruzan a  $<-90 \text{ mV}$ . Lo que se aproxima al potencial de equilibrio del ión  $\text{K}'$ .

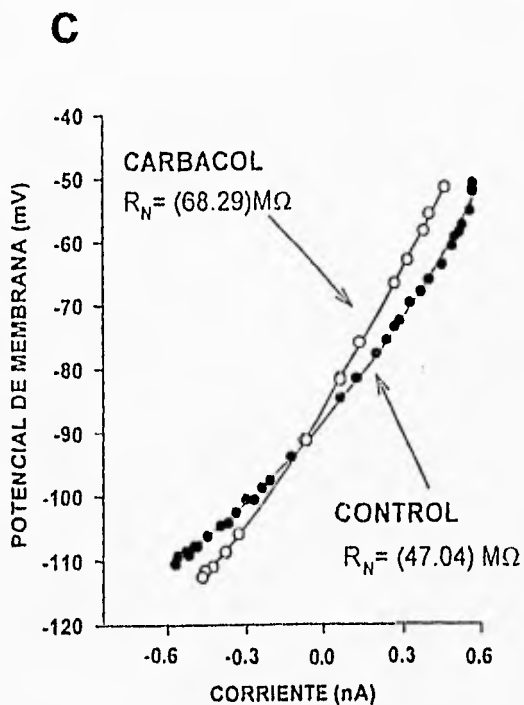
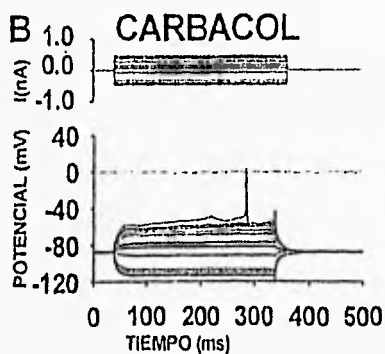
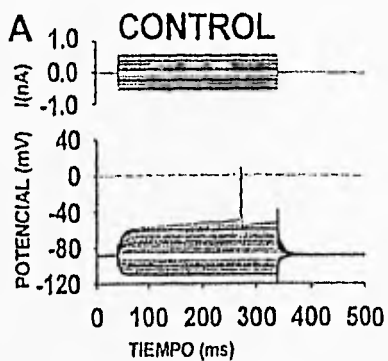


Figura 13. Efecto del carbaccol sobre la resistencia de entrada .  
Registros de voltaje a diferentes corrientes de estimulación, en  
condiciones control (A), en presencia de carbaccol (B). Función  
voltaje contra corriente (C).

EFFECTO DEL CARBACOL SOBRE EL POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE QUE  
SIGUE A UN TREN DE POTENCIALES DE ACCION.

En la figura 14 se muestran trenes de potenciales de acción provocados por pulsos de corriente despolarizante de la misma intensidad, en condiciones control y en presencia de carbacol (1 $\mu$ M).

En A se muestra un tren de potenciales de acción, seguido por un postpotencial hiperpolarizante (PPH) en condiciones control. La línea punteada indica el potencial de mantenimiento en el que fué realizado el experimento ( $\approx$ -60 mV).

En B se muestra el registro de la misma célula, pero en presencia de carbacol. Se puede observar que el carbacol redujo la amplitud y la duración del postpotencial hiperpolarizante, que sigue al tren de potenciales de acción, así como los intervalos interespigas. Lo cual originó un aumento en la frecuencia de disparo y un mayor número de potenciales de acción en respuesta al mismo estímulo despolarizante.

En C se muestra una amplificación de los PPH sobrepuestos que siguieron al tren de potenciales de acción en ambas condiciones (control y presencia de carbacol), en donde se nota con claridad una disminución de la duración y la amplitud del PPH haciendo evidente el efecto bloqueador del carbacol en 71% con una amplitud promedio de 1.51 mV  $\pm$  1.32 (n=3).

Ambas observaciones se hicieron al mismo potencial de mantenimiento y en la misma intensidad de estimulación.

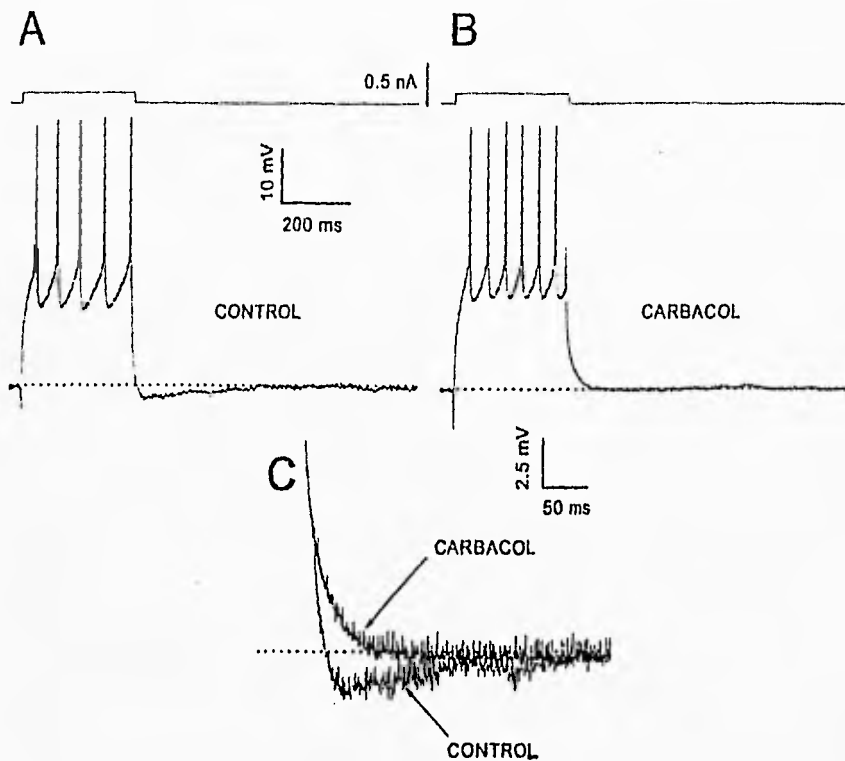


Figura 14. Acción del carbacol sobre la frecuencia de disparo y el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un tren de potenciales de acción ( $n=3$ ). Trenes de potenciales de acción con sus respectivos pulsos de corriente (arriba) en condiciones control y en presencia de carbacol ( $1\mu\text{M}$ ) (A y B). En (C) Sobreposición de los postpotenciales en ambas condiciones. La línea punteada señala el potencial de mantenimiento (aproximadamente  $-60\text{ mV}$ ). El pulso de corriente aplicada fue de  $0.1\text{ nA}$ .

En la figura 15 se muestran las gráficas de los datos estadísticos tanto de la amplitud del PPH en condiciones control (promedio 3.46 mV  $\pm$  1.07, n=3), y en presencia de carbacol (promedio 1.51 mV  $\pm$  1.32, n=3) , así como la duración del PA en condiciones, control (promedio 2.25 ms  $\pm$  0.19, n=7), y en presencia de carbacol (promedio 2.57 ms  $\pm$  0.19, n=8).

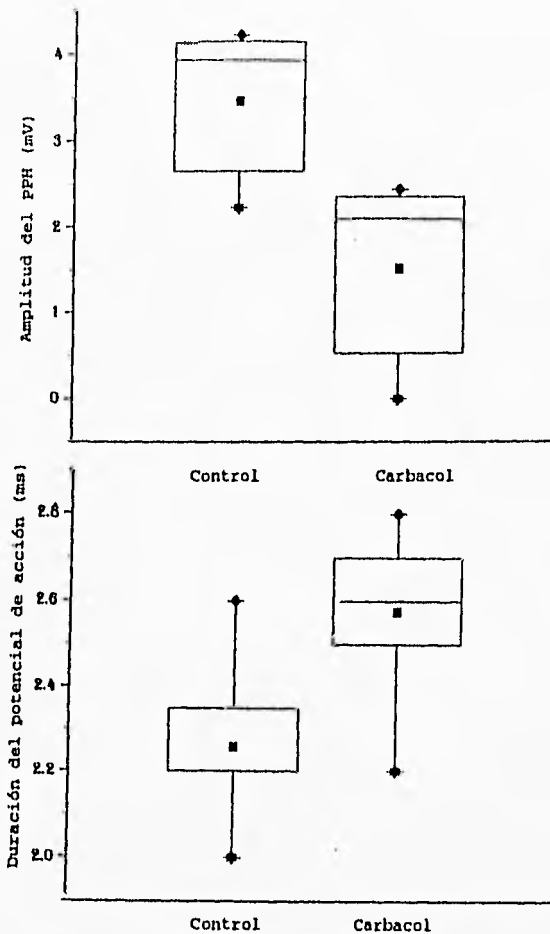


Figura 15. En la siguiente figura se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la amplitud del PPH en condiciones control (promedio 3.46 mV  $\pm$  1.07, n=3) y en presencia de carbacol (promedio 1.51 mV  $\pm$  1.32, n=3) (arriba), así como las gráficas de los datos estadísticos referentes a la duración del PA en las mismas condiciones: control (promedio 2.25 ms  $\pm$  0.19, n=7) y en presencia de carbacol (promedio 2.57 ms  $\pm$  0.19, n=8) (abajo).

En la figura 16 se muestra la gráfica de número de espigas contra tiempo en respuesta a un pulso de corriente despolarizante en otra célula del neocóstriado en condiciones control (círculos llenos) y después de añadir carbacol (círculos vacíos), al medio (1mM). Se observa que en presencia de carbacol el número de espigas aumenta con respecto al control, es decir aumenta la frecuencia de disparo. Cabe mencionar también que la duración del potencial de acción en condiciones control tuvo un promedio de promedio  $2.25 \text{ ms} \pm 0.19$ ,  $n=7$  y que en presencia de carbacol un promedio de  $2.57 \text{ ms} \pm 0.19$ ,  $n=8$  (no se muestra).

En la figura (B) se muestran las curvas de adaptación (frecuencia contra tiempo), en condiciones control (círculos llenos) y en presencia de carbacol (círculos vacíos).

Las curvas obtenidas en condiciones control y en presencia de carbacol fueron ajustadas a una suma de dos funciones exponenciales: una rápida con una  $\tau$  de  $\approx 23 \text{ ms}$  y una lenta con una  $\tau$  de  $\approx 839 \text{ ms}$ . Como puede observarse en ambas condiciones hay adaptación de la frecuencia de disparo. Estos experimentos sugieren que aunque el carbacol induce un aumento de la frecuencia ante el mismo estímulo una disminución del PPH, estos efectos no implican cambios en la adaptación.



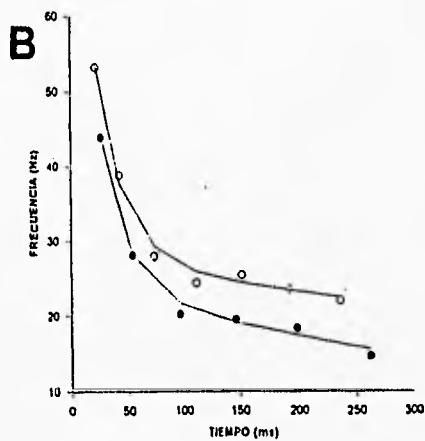
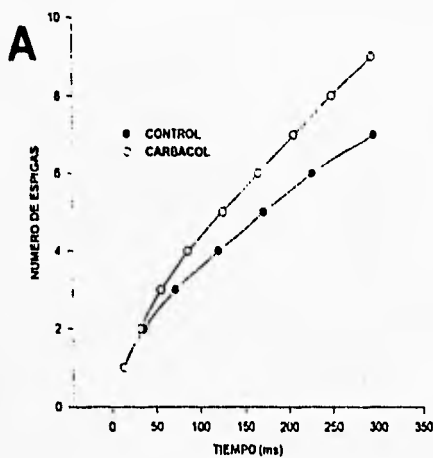


Figura 16. Acción del carbacol sobre la frecuencia de disparo de las neuronas neocorticales. Gráfica de número de espigas contra tiempo de una célula en condiciones control y en presencia de carbacol (A) y en (B) gráfica de frecuencia vs tiempo. Ambas curvas se pueden ajustar a dos funciones exponenciales.

## PARTICIPACIÓN DE LAS CORRIENTES TRANSITORIAS

Con el objeto de evaluar la participación de corrientes transitorias de  $K^+$  sensibles a 4-amino-piridina en la respuesta al carbacol, se realizaron algunos experimentos en presencia de este bloqueador.

En la figura 17 se muestra una serie de trenes de potenciales de acción con sus respectivos PPH provocados por la aplicación de un pulso cuadrado de corriente despolarizante en una misma célula. En condiciones control (A), en presencia de 4-AP (1mM) (B), en presencia de 4-AP + carbacol (1mM) (C) y después del lavado (D). Note la aparición de potenciales de acción después del pulso tanto en B como en C. En la figura E se muestra la sobreposición amplificada de los postpotenciales hiperpolarizantes de la célula en condiciones control, con una amplitud promedio de  $2.5 \text{ mV} \pm 0.26$ ,  $n=2$ , y en presencia de 4-AP, donde se puede observar que la 4-AP disminuye un 27% la amplitud del postpotencial hiperpolarizante (PPH) teniendo un promedio de  $3.22 \text{ mV} \pm 0.25$ ,  $n=2$ . La aplicación de carbacol ( $1\mu\text{M}$ ) en presencia de 4-AP produce el bloqueo del postpotencial hiperpolarizante teniendo un promedio de  $0.64 \text{ mV} \pm 0.91$ ,  $n=2$  (F). Después de lavar (por 25 minutos) hay una recuperación del PPH, es decir ambos efectos del carbacol y de la 4-AP son reversibles (G).

En todas las figuras la línea punteada indica el potencial de mantenimiento en que se aplicó el pulso de corriente despolarizante, el cual fué de aproximadamente  $-60 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ .

El resultado fue que la 4-AP no ocluyó el efecto del carbacol.

Lo que sugiere que este no está actuando sobre las conductancias transitorias de  $\text{K}^+$  sensibles a 4-AP. Por otro lado el pro efecto de la 4-AP sobre el PPH posterior al tren indica que estas conductancias no son principales en la generación de este fenómeno.

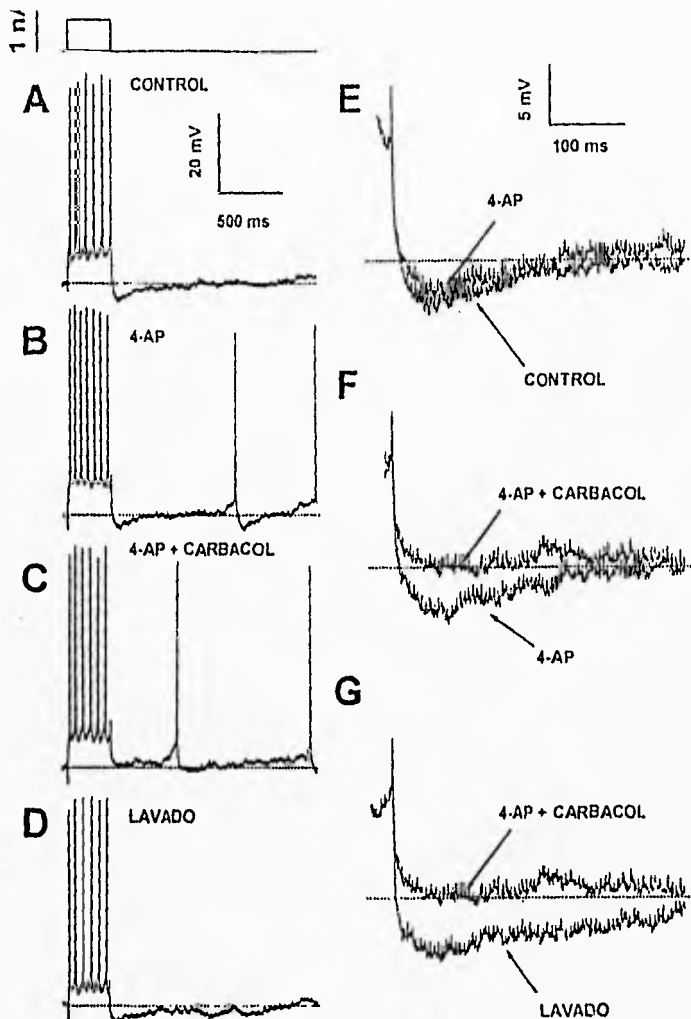


Figura 17. Acciones de la 4-AP y el carbacol sobre el PPH en las neuronas neostriatales. Trenes de potenciales de acción provocados por un pulso cuadrado de corriente de 0.72 nA, condición control (A), en presencia de 4-AP (B), en presencia de 4-AP + carbacol (C) y después del lavado (D). Sobreposición de los postpotenciales de las diversas condiciones experimentales (E, F y G).

En la figura 18 se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la amplitud del PPH en condiciones control con una amplitud promedio de  $2.5 \text{ mV} \pm 0.26$ ,  $n=2$ , en presencia de 4-AP con un promedio de  $3.22 \text{ mV} \pm 0.25$ ,  $n=2$  y en presencia de 4-AP + carbacol con un promedio de  $0.64 \text{ mV} \pm 0.91$ ,  $n=2$  (arriba), también se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA en las mismas condiciones: control con un promedio de  $1.92 \text{ ms} \pm 0.10$ ,  $n=11$ , en presencia de 4-AP con un promedio de  $2.3 \text{ ms} \pm 0.09$ ,  $n=10$ , y en presencia de 4-AP + carbacol con un promedio de  $2.48 \text{ ms} \pm 0.23$ ,  $n=12$  (abajo).

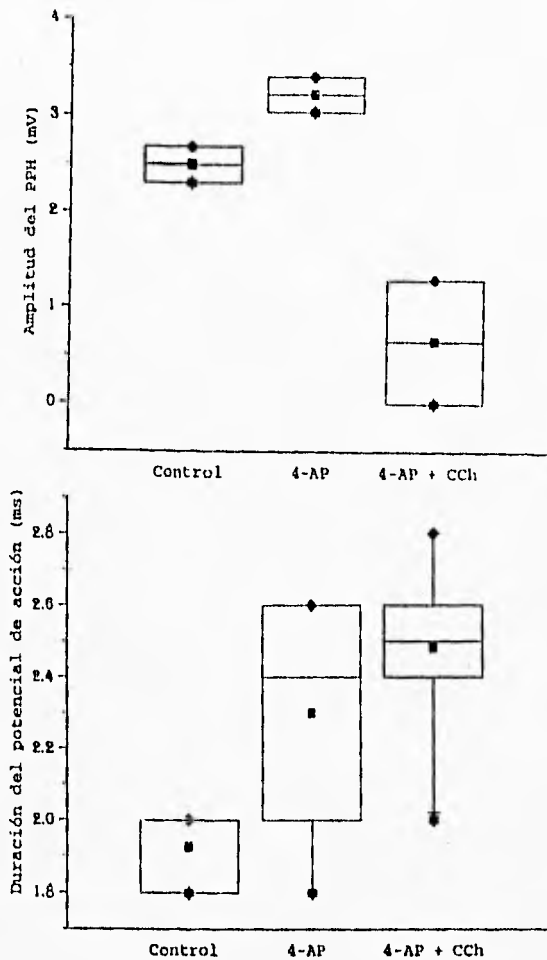


Figura 18. En esta figura se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la amplitud del PPH en condiciones control (n=2), en presencia de 4-AP + carbacol (n=2) (arriba). También se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA bajo las mismas condiciones, control (n=11), en presencia de 4-AP (n=10), y en presencia de 4-AP + carbacol (n=12) (abajo).

En la figura 19 A se muestra en otro experimento la gráfica del número de espigas contra tiempo de una célula neoestriatal, donde se observa que en presencia de 4-AP hay un ligero aumento en el número de potenciales de acción con respecto a la condición control. El intervalo entre espigas en presencia de 4-AP, en general se hace más irregular. Después de aplicar el carbacol en presencia de 4-AP, se incrementa aún más el número de potenciales de acción ante un mismo estímulo. En la figura (B) se muestran las curvas de adaptación (frecuencia vs tiempo) donde cada una pudo ser ajustada a la suma de dos funciones exponenciales. El cambio más importante es que la 4-AP aumenta la frecuencia de disparo al inicio de la respuesta (lo que refleja mayor adaptación).

El carbacol no produjo cambios adicionales a la 4-AP sobre la adaptación. En general las tres curvas presentan adaptación. Los potenciales de acción presentaron en las diferentes condiciones los siguientes promedios en su duración: control con un promedio de  $1.92 \text{ ms} \pm 0.10$ ,  $n=11$ , en presencia de 4-AP con un promedio de  $2.3 \text{ ms} \pm 0.09$ ,  $n=10$ , y en presencia de 4-AP + carbacol con un promedio de  $2.48 \text{ ms} \pm 0.23$ ,  $n=12$ .

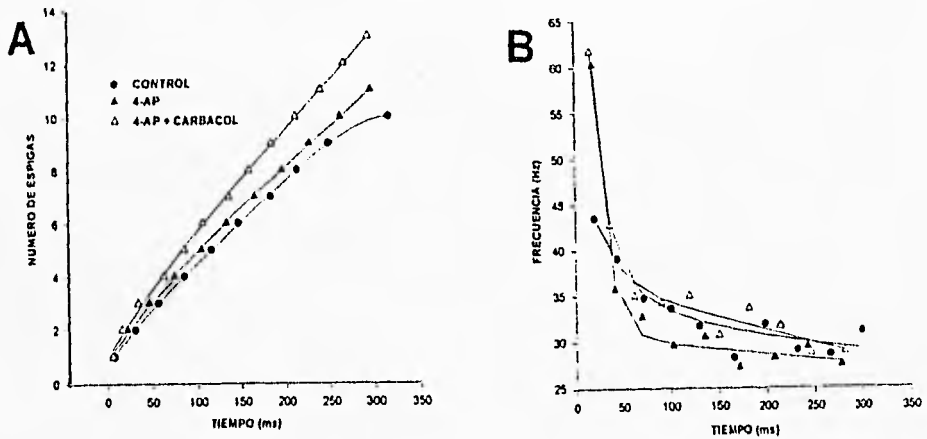


Figura 19. Acción de la 4-AP y del carbacol sobre la frecuencia de disparo de una célula de neocórtico. Gráfica de número de espigas contra tiempo de una célula en condiciones control, en presencia de 4-AP y carbacol en presencia de 4-AP (A). Gráfica de frecuencia contra tiempo, donde las curvas se ajustan a dos funciones exponenciales (B).



## ¿QUE TANTO PARTICIPAN LAS CORRIENTES PERSISTENTES?

Con el objeto de estudiar el efecto del carbacol sobre el PPH, después de bloquear corrientes persistentes de K', se realizaron protocolos en presencia de 2mM de Tetraetilamonio (TEA).

En la figura 20 se muestran los registros obtenidos en una neurona en Krebs normal (control A), después de aplicar 2 mM de TEA al medio (B) y en respuesta a 1 $\mu$ M de carbacol en el medio conteniendo TEA (C). En D se muestran sobrepuestos los PPH en control (con una amplitud promedio de 2.39 mV  $\pm$  1.2, n=2) y TEA amplificados. Nótese que el TEA produce un incremento en el PPH de 58% con una amplitud promedio de 5.7 mV  $\pm$  0.95, n=2. Bajo estas condiciones el carbacol aun puede reducir el PPH un 64%, presentando una amplitud promedio de 3.58 mV  $\pm$  0.13, n=2. Lo que sugiere que el carbacol tampoco está actuando sobre conductancias sensibles a TEA; entre esta se encuentra una conductancia activada por calcio y voltaje y acarreada por los canales BK.

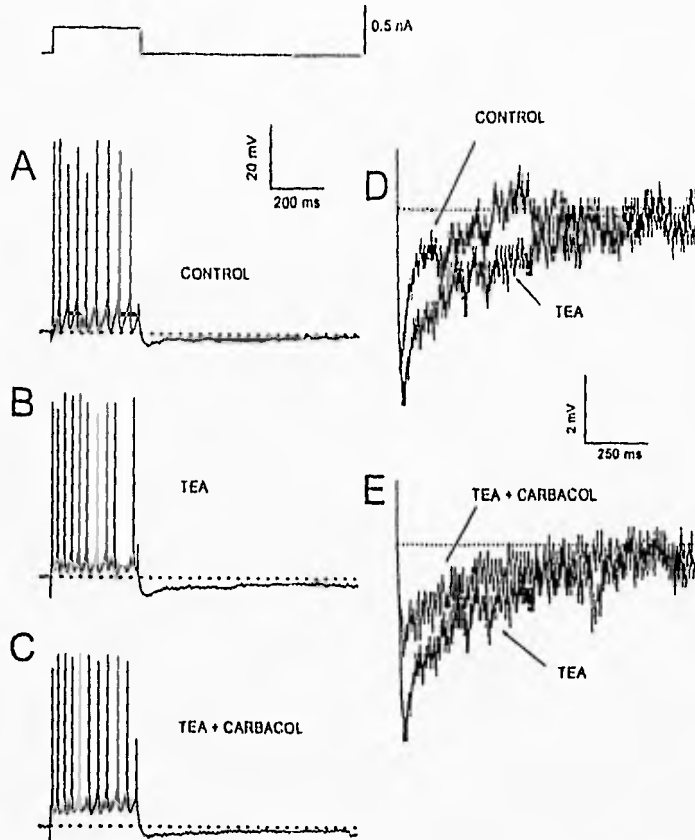


Figura 20. Acción del TEA y del carbacol sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un tren de potenciales de acción. Trenes de potenciales de acción inducidos por un pulso de corriente aplicada (arriba) en condiciones control, en presencia de TEA (2 mM) y en presencia de TEA + carbacol (1 μM) (A, B y C). En D y E se sobreponen los postpotenciales hiperpolarizantes de las condiciones experimentales. La línea punteada señala el potencial de mantenimiento (aproximadamente -60 mV). El pulso de corriente aplicada fue de 0.3 nA.

En la figura 21 se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la amplitud del PPH en condiciones control, con una amplitud promedio de  $2.39 \text{ mV} \pm 1.2$ ,  $n=2$ , en presencia de TEA, con una amplitud promedio de  $5.7 \text{ mV} \pm 0.95$ ,  $n=2$ . y en presencia de TEA + carbacol, con una amplitud promedio de  $3.58 \text{ mV} \pm 0.13$ ,  $n=2$ , así como las gráficas de los datos de la duración del PA en presencia de TEA con un promedio de  $3.68 \text{ ms} \pm 0.05$ ,  $n=10$  y en presencia de TEA + carbacol con un promedio de  $4.22 \text{ ms} \pm 0.08$ ,  $n=8$ .

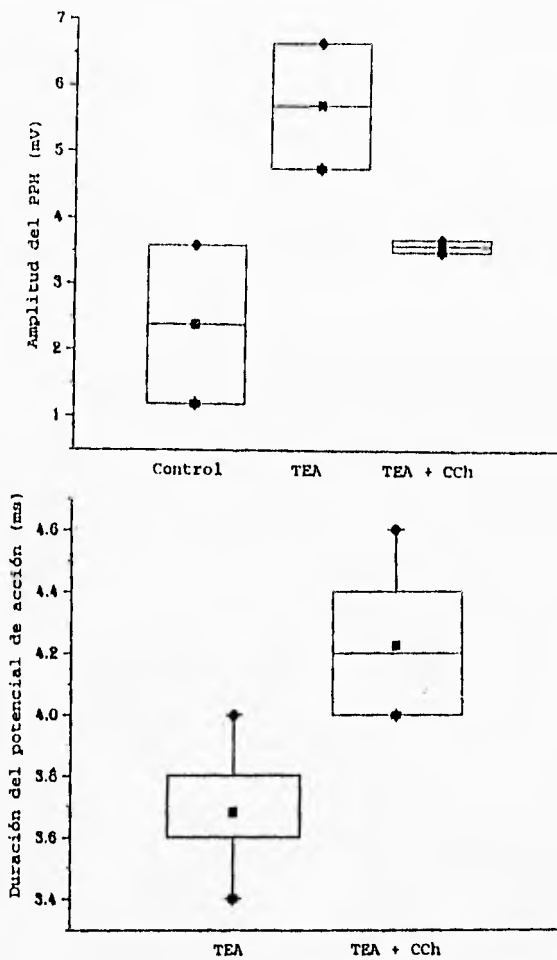


Figura 21. En esta figura se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la amplitud del PPH en condiciones control (n=2), en presencia de TEA (n=2) y en presencia de TEA + carbacol (n=2) (arriba). También se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA en presencia de TEA (n=10) y en presencia de TEA + carbacol (n=8) (abajo).

En la figura 22, se muestra en otra célula la gráfica del número de potenciales de acción contra tiempo. En control (círculos llenos), en presencia de TEA (rombos llenos) y al añadir carbacol (triángulos vacíos). En este caso se puede apreciar una disminución en el número de potenciales de acción en presencia de TEA respecto al control. Esto concuerda con el aumento del PPH que el TEA produce. El carbacol (1 $\mu$ M) en presencia de TEA (2mM) (triángulos vacíos) fue capaz de inducir un aumento del número de potenciales de acción ( $\Delta$ ). Los potenciales de acción presentados bajo estas condiciones presentaron una duración promedio de: 3.68 ms  $\pm$  0.05, n=10 en presencia de TEA y 4.22 ms  $\pm$  0.08, n=8 en presencia de TEA + CCh.

En (B) se muestran las curvas de adaptación (frecuencia vs tiempo) donde se observa que el disparo en todas las condiciones pudo ser ajustado a la suma de dos exponenciales.

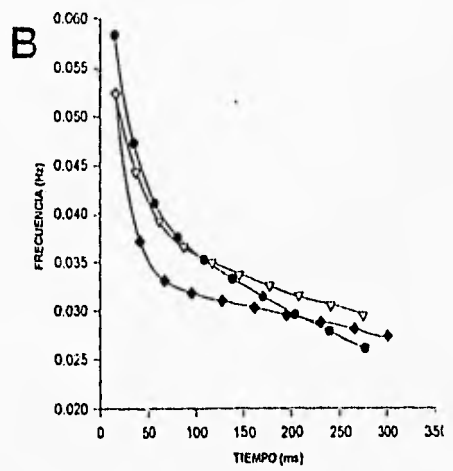
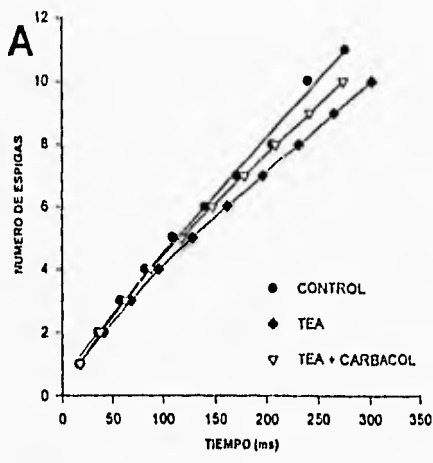


Figura 22. Acción del TEA y el carbacol sobre la frecuencia de disparo sobre los trenes de potenciales de acción de una neurona neocortical. Gráfica del número de espigas contra tiempo de una célula en presencia de TEA y en presencia de TEA + carbacol (A). Gráfica de frecuencia contra tiempo en presencia de TEA y en presencia de TEA + carbacol, con curvas ajustadas a la suma de dos funciones exponenciales (B).

EFFECTO DE LOS BLOQUEADORES DE CORRIENTES DE K' DEPENDIENTES DE  
Ca<sup>2+</sup>

En la figura 23 se muestran los trenes de potenciales de acción y sus postpotenciales hiperpolarizantes producidos por un pulso de corriente despolarizante. El tren en condición control muestra un postpotencial evidente (A), en cambio en presencia de apamina (1 $\mu$ M) el postpotencial se ve claramente reducido tanto en su amplitud como en su duración (aproximadamente 75%), al grado de prácticamente perderse (B). En la parte de abajo se sobreponen los PPH amplificadas de cada condición, en donde se hace evidente la reducción del PPH en presencia de apamina.

Las líneas punteadas indican el potencial de mantenimiento de la célula, el cual fué de aproximadamente -65 mV. De esta manera, el único bloqueador de corrientes de K' probado que tuvo efectos similares al carbacol fue la apamina.

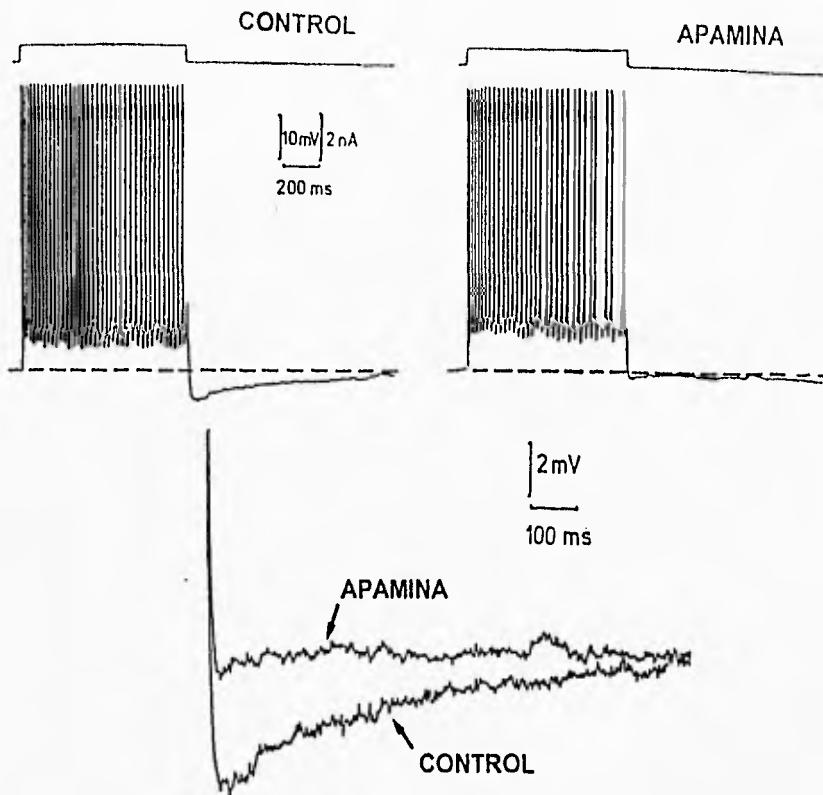


Figura 23. Efecto de la apamina sobre el postpotencial hiperpolarizante después de un tren de potenciales de acción. En (A) se muestra un tren de potenciales de acción en condiciones control, en (B) un tren de potenciales de acción en presencia de apamina, y en (C) la sobreposición de los PPH de ambas condiciones. La línea punteada indica el potencial de mantenimiento (aproximadamente  $-60$  mV). El asterisco indica el cambio observado en el PPH.



En la figura 24 se muestran los registros electrofisiológicos de un solo PA en una neurona de neocórtex. Fueron tomados de un tren de PAs en condiciones control y después de aplicar TEA (2mM). Se observa que el TEA produjo un ensanchamiento del PA, es decir un aumento en su duración con un promedio de  $5.67 \text{ ms} \pm 0.53 (n=2)$ .

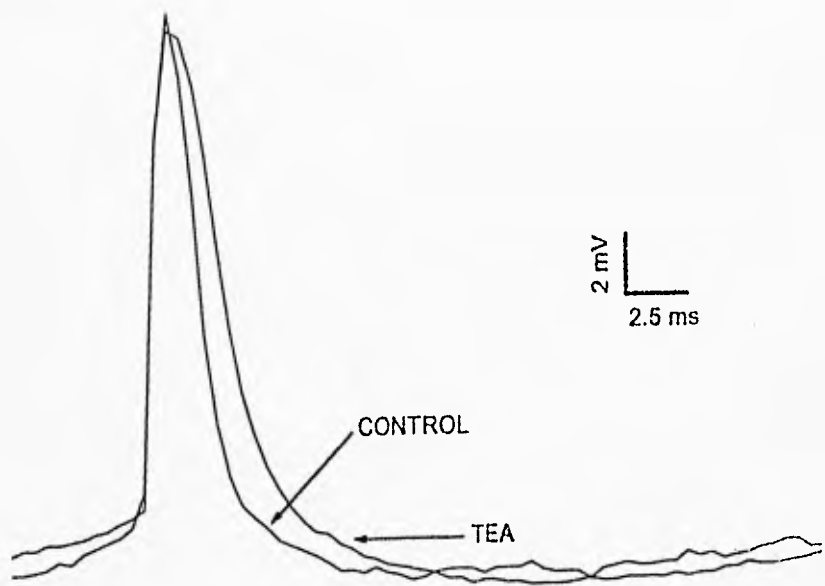


Figura 24. Efecto del TEA sobre un solo potencial de acción. Se muestra un PA en condiciones control y después de la aplicación de TEA (2mM) (n=2). El potencial de mantenimiento de la célula fue de aproximadamente -60 mV.

En la figura 25. se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA en condiciones control, con una duración promedio de  $3.41 \text{ ms} \pm 0.46$ ,  $n=2$  y en presencia de TEA con una duración promedio de  $5.67 \text{ ms} \pm 0.37$ ,  $n=2$ .

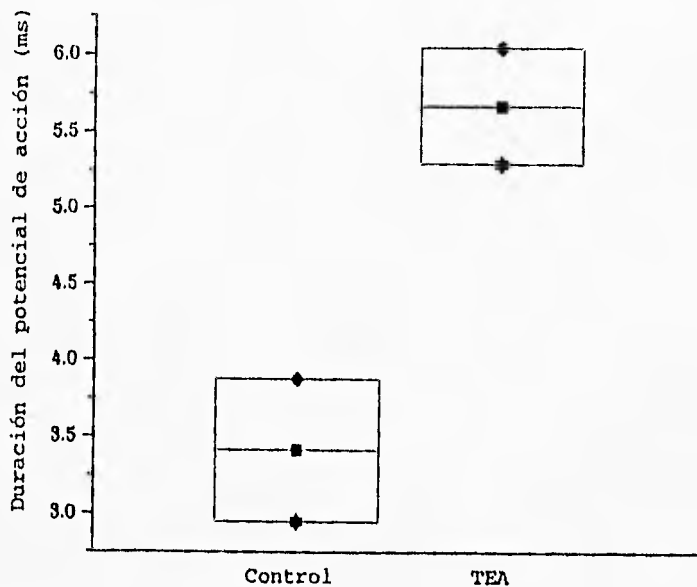


Figura 25. En esta figura se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA en condiciones control (n=2) y en presencia de TEA (n=2).

En la figura 26 se muestra el registro electrofisiológico (en otra neurona) de un sólo potencial de acción provocado por un pulso de corriente despolarizante de aproximadamente 330 ms en una neurona de neoestriado en presencia de 2mM de TEA y en presencia de TEA + carbacol (1 $\mu$ M). Se puede apreciar un aumento del 29% en la duración del potencial de acción en presencia de TEA + CCh con un promedio de 5.38 ms  $\pm$  0.53 (n=2).

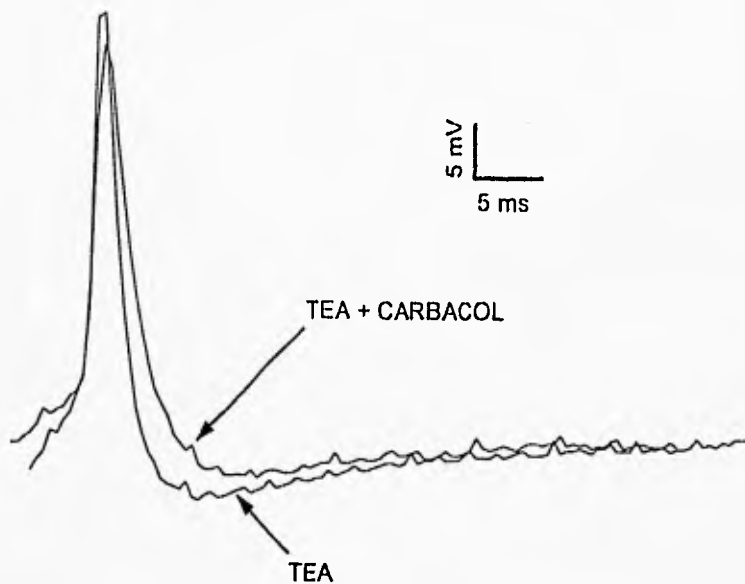


Figura 26. Efecto del TEA y carbacol sobre un potencial de acción. Se muestra un potencial de acción provocado por un pulso despolarizante, en presencia de TEA y en presencia de TEA + carbacol (n=2). El potencial de mantenimiento de la célula fue de aproximadamente -60 mV.

En la figura 27 se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA en presencia de TEA, con un promedio de  $4.03 \text{ ms} \pm 0.19$ ,  $n=2$  y en presencia de TEA + carbacol, con un promedio de  $5.38 \pm 0.38$ ,  $n=2$ .

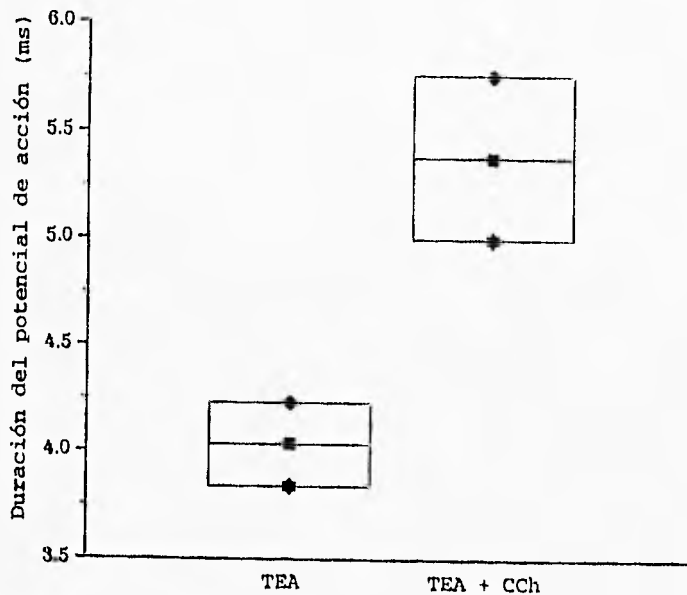


Figura 27. En esta figura se muestran las gráficas de los datos estadísticos de la duración del PA en presencia de TEA (n=2) y en presencia de TEA + carbacol (n=2).



Paralelamente en el laboratorio se realizaron experimentos de fijación de voltaje para observar la influencia de ciertos bloqueadores sobre las corrientes salientes en las neuronas neoestriatales. Previamente se ha visto que el  $\text{Cd}^{2+}$  bloquea selectivamente conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral de activación en estas neuronas (Bargas et al., 1994).

En la figura 28 se muestra una gráfica de corriente contra tiempo de un experimento de fijación de voltaje en neuronas neoestriatales. Se observa la disminución de la amplitud de las corrientes salientes producidas por un pulso comando a 0 mV, debido a la aplicación de diversos fármacos (4-AP,  $\text{Cd}^{2+}$  y TEA).

En el lado izquierdo inferior se enseñan muestras de las corrientes salientes observadas durante el experimento. Las barras indican el tiempo de aplicación de los fármacos.

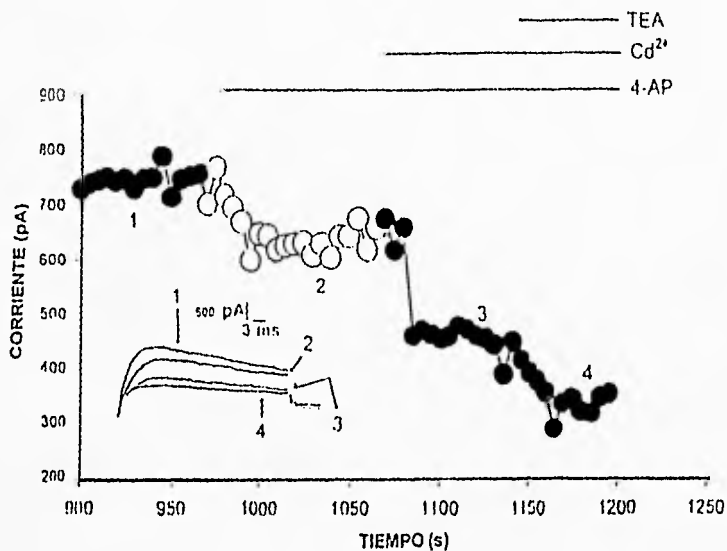


Figura 28. Acciones de 4-AP,  $\text{Cd}^{2+}$  y TEA sobre las corrientes salientes de una neurona neocortical. Gráfica de corriente contra tiempo donde se muestra la disminución de la amplitud al pico de las corrientes producidas por un pulso de voltaje a 0 mV. En el lado izquierdo inferior se muestran las corrientes salientes observadas en el experimento. En el lado derecho superior se muestran por medio de barras los momentos en que se aplicaron los fármacos (4-AP,  $\text{Cd}^{2+}$  y TEA).

## DISCUSION

En este trabajo se demuestra que el carbacol reduce el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un tren de potenciales de acción en las neuronas espinosas medianas del neocórtex de la rata. También aportamos algunas evidencias de que el carbacol podría estar actuando sobre conductancias activadas por  $Ca^{2+}$  y no sobre conductancias sensibles a 4-AP o TEA.

### CARACTERISTICAS ELECTROFISIOLOGICAS DE LAS NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS DEL NEOCÓRTEX

Las características electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas presentadas en este trabajo son similares a las consideradas en trabajos previos realizados en estas células.

La resistencia de entrada obtenida en este estudio concuerda con la reportada previamente: 20-60 M $\Omega$ . Del mismo modo el potencial de reposo registrado fué de  $\approx -80$  mV (Wilson, 1990; Kita et al, 1984; Jiang y North, 1991; Pineda et al, 1992; Galarraga et al, 1994; Pineda, 1995; Flores-Hernández, 1995). El decremento en la frecuencia de disparo neuronal respecto al tiempo, es decir la adaptación de la frecuencia de disparo, no es marcada en estas células (Kita et al., 1984; Sawczuk et al., 1995) y depende del potencial de mantenimiento, siendo mayor a potenciales más despolarizados, no obstante es atribuida no sólo

a corrientes de potasio activadas por  $Ca^{2+}$  sino a la participación de otras corrientes (Pineda et al., 1992; Madison y Nicoll, 1984). Con respecto a la relación corriente voltaje donde se ve que esta no es lineal, estudios previos han mostrado que se debe a que estas neuronas presentan una rectificación entrante a todo lo largo de la función corriente-voltaje, donde la resistencia se incrementa con la despolarización de la membrana y se hace menor a potenciales hiperpolarizados. Esta rectificación se denomina anómala (Wilson, 1990; Flores-Hernandez, 1995).

#### EFFECTOS DEL CARBACOL SOBRE LA RESISTENCIA DE ENTRADA DE LAS NEURONAS NEOESTRIATALES

Al comparar las pendientes de las curvas I/V en condiciones control y experimental, se observó que en presencia de carbacol se aumentó significativamente la resistencia de entrada membranaral prácticamente en todo el intervalo subumbral del potencial de membrana presentando un promedio de  $70.07 M\Omega \pm 12.45$  (n=4) (figura 13).

Este efecto ya había sido discutido previamente en las neuronas del neocortico. El incremento en la resistencia de la membrana puede producir por si sólo un incremento en la frecuencia de disparo; ya que bajo estas condiciones se requeriría menor corriente para producir un mayor número de potenciales de acción (Pineda et al., 1995).

Las conductancias involucradas en este cambio de resistencia se están estudiando actualmente en el laboratorio. Aparentemente el cambio de resistencia está dado primordialmente por el cierre de una conductancia de potasio perteneciente a la familia de los rectificadores anómalos (Hernández-López et al datos no publicados).

#### EFFECTOS DEL CARBACOL SOBRE EL POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE

En trabajos anteriores se han reportado los efectos del carbacol sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un sólo potencial acción en las neuronas del neocórtex, donde se ha visto que el carbacol disminuye este PPH (Pineda, 1995).

Para este trabajo de tesis se estudió el efecto del carbacol sobre el PPH después de un tren de potenciales de acción.

El disparo registrado en condiciones fisiológicas en vivo es en forma de trenes (Wilson, 1990). Por lo que resulta de suma importancia el estudiar el PPH que sigue al disparo repetitivo así como su modulación por el carbacol. Este PPH sería el factor limitante de la duración de estos trenes y todo lo que regula su duración regulará la respuesta de estas células.

Los experimentos realizados para esta tesis demuestran que el PPH que sigue a un tren de PAs también es disminuido por el carbacol, reduciendo su amplitud en un 71% con una amplitud promedio de  $1.51 \text{ mV} \pm 1.32$  ( $n=3$ ) (figura 14). En el caso del PPH que sigue a un sólo PA la acetilcolina actúa a través de

receptores muscarínicos, los cuales están involucrados en este decremento, ya que el CCh ( $1\mu\text{M}$ ) en presencia de ( $1\mu\text{M}$ ) de atropina (antagonista muscarínico) no produce ningún efecto (Pineda et al, 1995). Los receptores muscarínicos involucrados son del tipo M1, (Pineda, 1995).

Aunque para este estudio no se hicieron experimentos con antagonistas de receptores muscarínicos es probable que el efecto del carbacol estudiado sobre el PPH que sigue a un tren de PAS sea a través de receptores tipo M1 como en el caso del PPH que sigue a un solo PA, ya que:

1. El efecto se observó en todas las células estudiadas (M1 esta presente en todas las neuronas espinosas medianas a diferencia de otros receptores).
2. Parte de la conductancia involucrada es la misma ( $gK_{Ca}$ ).

El efecto del carbacol sobre el PPH que sigue a un tren de PAS da como resultado un incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (ver figura 14), y lo hace por dos mecanismos: aumentando la resistencia de entrada neuronal y reduciendo la amplitud del PPH que sigue a cada PA (ver figura 12).

Es importante mencionar que se conoce la participación de una serie de conductancias durante el disparo de un sólo potencial de acción, sin embargo no se conocen con exactitud las conductancias que participan durante un tren de potenciales de acción. Se podría pensar que las conductancias participantes serían las mismas, en ambas situaciones, pero parece que ese no es el caso,

pues se ha observado que durante un tren de PAs existe una diferencia entre los primeros y los últimos potenciales, al igual que entre los primeros y los últimos intervalos entre espigas, con lo cual se hace evidente una participación distinta de conductancias durante el transcurso de tiempo que dura el pulso de estimulación, pero surge la pregunta, ¿cuales son esas conductancias?.

#### EFFECTO DE LA 4-AP SOBRE EL POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE

La 4-amino piridina (4-AP) reduce a las corrientes transitorias de  $K^+$  (Rudy, 1988; Flores-Hernandez et al., 1993).

Las corrientes de potasio transitorias dependientes de voltaje ( $I_A$  e  $I_D$ ) contribuyen en la repolarización de PAs en las células de neocórtex, a la latencia de disparo y la adaptación de la frecuencia (Pineda, 1995).

En varias neuronas parecen contribuir en el PPH, como en el caso de las células piramidales de hipocampo y en motoneuronas vagales (Storm, 1987; Sah y McLachlan, 1992).

La presencia del bloqueador del canal de potasio, 4-AP, incrementa la probabilidad de que el carbacol pueda inducir disparos rítmicos (Blanchi y Wong, 1994).

La 4-AP provoca un aumento en la frecuencia de disparo en las neuronas neocórtexiales y una reducción del PPH que sigue a un PA. Sin embargo el efecto sobre el PPH que sigue a un tren de potenciales de acción, no es importante (figura 17), lo cual nos

indica una pequeña participación de las corrientes transitorias en tal evento. Por lo tanto, estas corrientes son más importantes en la modulación del ritmo de disparo y el umbral del PA que en el PPH que limita el tren (Pineda et al, 1992).

En los resultados obtenidos se observó que el carbacol disminuye el PPH aun en presencia de 4-AP con un promedio de 0.64 mV  $\pm$  0.91, n=2, por lo tanto concluimos que este tipo de corrientes no son el blanco principal de este agonista.

#### PARTICIPACION DE LAS CORRIENTES PERSISTENTES

Se ha demostrado que el TEA retrasa la repolarización del potencial de acción y reduce el PPH después de un sólo potencial de acción a dosis menores de 1 mM (Pineda et al., 1992). En los experimentos presentados en este trabajo se vió que la aplicación de una mayor dosis de tetraetilamonio (TEA, 2mM) provoca un aumento del PPH que sigue a un tren de potenciales de acción (figura 20).

El TEA a bajas concentraciones bloquea las conductancias de K<sup>+</sup> activadas por Ca<sup>2+</sup> tipo I<sub>c</sub> y parte de las corrientes persistentes (canales BK, Rudy, 1988; Pineda et al., 1992).

Por lo tanto, en presencia de 2 mM de TEA:

1. Se encuentran bloqueados los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> tipo I<sub>c</sub> por lo que en el PPH esta conductancia ya no participa, predominando la participación de la I<sub>AHP</sub>. También se bloquean corrientes persistentes dependientes de voltaje.



2. Adicionalmente al bloqueo de las conductancias de  $K^+$  se tiene un incremento en la entrada de  $Ca^{2+}$ , lo cual se evidencia por:

- a) El incremento en la duración del PA (figura 24)
- b) El aumento en el PPH

En la figura 20 de este trabajo se muestra que el carbacol disminuye el PPH que sigue a un tren de PAs en presencia de TEA a pesar del aumento en la entrada de  $Ca^{2+}$  provocado por el TEA.

Es más, en la figura 26 se observa que en presencia de TEA el carbacol puede bloquear el PPH que sigue a un solo PA en condiciones en que la entrada de  $Ca^{2+}$  es muy evidente (la duración del PA es aún mayor). Esto demuestra que el efecto muscarínico no es ni sobre la  $I_c$  ni sobre las corrientes persistentes sensibles a TEA, también sugiere la modulación directa de una conductancia de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  que no es bloqueada por TEA.

#### **EFFECTOS DE LA APAMINA SOBRE EL POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE QUE SIGUE A UN TREN DE POTENCIALES DE ACCIÓN**

En la figura 23 se muestra que el PPH que sigue al tren de potenciales de acción, es bloqueado por la apamina, indicando esto que hay una activación de canales de potasio activados por  $Ca^{2+}$  del tipo SK ( $I_{SK}$ ).

Para el caso de un solo potencial de acción la apamina también reduce la amplitud del PPH, incrementa la frecuencia de disparo y no afecta la repolarización del potencial de acción. El bloqueo

por apamina no es reversible (Pineda et al., 1992). Por tanto muy probablemente la principal conductancia responsable de este PPH que sigue a un tren de PAs es la  $I_{AHP}$ : probablemente esta es la conductancia modulada por carbacol.

Finalmente experimentos de fijación de voltaje realizados en estas neuronas evidencian la presencia de las diferentes conductancias de  $K^+$  a las que se hace referencia en este trabajo: transitorias bloqueadas por 4-AP,  $K^+-Ca^{2+}$  del tipo  $I_c$  (BK) y sensibles a TEA.

Experimentos aún no publicados muestran que las 2 conductancias de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  están presentes en estas células ( $I_c$  bloqueada por caribdotoxina o TEA a bajas concentraciones y la  $I_{AHP}$ , bloqueada por apamina) y que estas corrientes pueden ser moduladas por el carbacol (Vilchis et al., 1996).

## CONCLUSION

1. Los experimentos realizados en este trabajo confirmaron que el PPH que sigue a un tren de PAs disminuye en presencia del carbacol, es decir, el carbacol, presenta un efecto modulador sobre este evento: provoca un aumento en la frecuencia de disparo y disminuye la resistencia de entrada neuronal.
2. La utilización de la 4-amino piridina (4-AP) demostró que las corrientes salientes transitorias tienen una pequeña participación en el PPH que sigue a un tren de PAs, ya que la

reducción que la 4-AP provoca en tal evento no es muy evidente.

También se vió que el carbacol disminuye el PPH que sigue a un tren de PAs aun en presencia de 4-AP, por lo cual este tipo de corrientes no han de ser el blanco principal de este agonista.

3. La aplicación de TEA (2mM) provoca un aumento en el PPH que sigue a un tren de PAs, así como al PPH que sigue a un solo PA.

El TEA bloquea las conductancias de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$  del tipo  $I_c$  y parte de la  $I_k$  persistente, por lo cual al encontrarse bloqueadas estas corrientes ya no tienen una gran participación en el PPH que sigue a un tren de PAs, predominando así la participación de la  $I_{AHP}$ . Adicionalmente se tiene un incremento en la entrada de  $Ca^{2+}$ , la cual se evidencia por el incremento en la duración del PA y el incremento en el PPH que le sigue (esto en un solo PA y después de un tren). No obstante el carbacol sigue disminuyendo el PPH que sigue a un tren de PAs en presencia de TEA a pesar del aumento en la entrada de  $Ca^{2+}$  provocada por el TEA. Esto sugiere que las conductancias bloqueadas por TEA ( $I_c$  e  $I_k$  persistentes) no son el blanco principal de la acción muscarínica en estas neuronas.

4. La apamina bloquea al PPH que sigue a un tren de PAs, lo que indica que hay una activación de canales de  $K^+$  dependientes por  $Ca^{2+}$  del tipo SK ( $I_{AHP}$ ). Por lo cual muy probablemente la principal conductancia responsable del PPH que sigue a un tren de PAs es la  $I_{AHP}$ , la cual provablemente es la modulada por el carbacol.

Se demostró que a diferencia del PPH que sigue a un sólo PA, la conductancia de  $K^+$  involucrada en el PPH que sigue a un tren de PA es predominantemente la corriente  $I_{AHP}$ .

Debido a que estas células, en condiciones in vivo, se encuentran la mayor parte del tiempo silentes y cuando disparan lo hacen en forma de rafagas de PAs, es de gran importancia el estudiar al PPH que sigue a un tren de espigas, así como su modulación por carbacol, ya que la modulación del PPH implicará la regulación de la duración de las respuestas de estas neuronas.

## BIBLIOGRAFIA

Albin, R. L., Young, A. B., y Penney, J. B. (1989). The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders. *TINS*. 12: 366-375.

Bargas, J., Galarraga, E. y Aceves, J. (1991). Dendritic Activity on Neostriatal Neurons as Inferred from Somatic Intracellular Recordings. *Brain Res*. 539: 159-163.

Bargas, J., Galarraga, E., y Surmeier, D. (1993). Neuronal Networks of the Mammalian Brain have Functionally Different Classes of Neurons: Suggestions for a Taxonomy of Membrane Ionic Conductances. En: Rudomin P, Arbib M. A, Cervantes-Pérez F, Romo R. Eds., Springer Verlag, Berlin. pp: 3-32.

Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y. y Surmeier D. J. (1994). Cellular and Molecular Characterization of Ca<sup>2+</sup> Currents in Acutely-Isolated, Adult Rat Neostriatal Neurons. *J Neurosci*. 14: 6667-6686.

Bargas, J., y Galarraga, E. (1995). Firing Response Modulation in Neostriatal Projection Neurons by Cholinergic and Dopaminergic Agonists. En: Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function, edited by M. A. Ariano and D. J. Surmeier. pp. 183-191.

Beckstead, R. M. (1984). The Thalamostriatal Projection in the Cat. *Journal of Comparative Neurology*. 223: 313-346.

Beckstead, R. M., Domesick, V. B. y Nauta, W. J. H. (1979). Efferent Connections of the Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area of the Rat. *Brain Res*. 175: 191-217.

Bianchi, R. y Wong, R. K. S. (1994). Carbacol-Induced Synchronized Rhythmic Bursts in CA3 Neurons of Guinea Pig Hippocampus In Vitro. *J. Neurophysiol*. 72 (1): 131-138.

Blatz, A. L., y Magleby, K. L. (1986). Single Apamin-Blocked Ca-Activated K<sup>+</sup> Channels of Small Conductance in Cultured Rat Skeletal Muscle. *Nature*. 323: 718-720.

Blatz, A. L. y Magleby, K. L. (1987). Calcium - Activated Potassium Channels. Trends Neurosci. 10: 463-467.

Blitzer, R. D., Wong, T., Nouranifar, R., y Laudan, E. M. (1994). The Cholinergic Inhibition of Afterhyperpolarization in Rat Hippocampus is Independent of cAMP - Dependent Protein Kinase. Brain Res. 646: 312-314.

Brown, A. M. (1990). Ionic Channels and Their Regulation by G Protein Subunits. Ann. Rev. Physiol: 197 - 213.

Cuello, A. C. (1987). Cholinergic Components of the Basal Ganglia. In: Neurotransmitter Interactions in the Basal Ganglia. Edited by M. Sandler, C. Feverstein, B. Scatton. Raven Press, New York, pp. 7-17.

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.

Davis, K. L., Hollister, L. E., Barchas, J. D., y Berger, P. A. (1976). Choline in Tardive Dyskinesia and Huntington's Disease, Life Sci. 19: 1507.

Difiglia. M. y Carey, J. (1986). Large Neurons in the Primate Neostriatum Examined with the Combined Golgi-Electron Microscopic Method. J. Comp. Neurol. 244: 36-52.

Dood, J., Ray, D., y Kelly, J. S. (1981). The Excitatory Action of Acetylcholine on Hippocampal Neurons of the Guinea Pig and Rat Maintained in Vitro. Brain Res. 207: 109-127.

Dreyer F. (1990). Peptide Toxins and Potassium Channels. Physiol. Biochem. Pharmacol. 115: 93-136.

Dutar, P. y Nicoll, R. A. (1988). Classification of Muscarinic Responses in Hippocampus in Terms of Receptor Subtypes and Second-Messenger Systems: Electrophysiological Studies in vitro. J. Neurosci. 8(11): 4214-4224.

Flores-Hernández., Pineda, C., Galarraga, E., y Bargas, J. (1993). Revisión de los Mecanismos de acción de la 4-AP a la Luz

de un Tipo de Conductancias de Potasio Descubierta Resientemente.  
Rev. Biomed. (4) 3: 141-151.

Flores-Hernández, J. (1995). Estudios de los Potenciales Sinápticos Inducidos por la 4-Aminopiridina en neuronas neostriatales de la rata. Tesis de doctorado. UNAM.

Fonnum, F., Grofova, I., Rinvik, E., Storm-Mathisen, J., y Walberg, F. (1974). Origin and Distribution of Glutamate Decarboxylase in Substantia Nigra of the Cat. Brain. Res. 71: 77-92.

Galarraga, E., Bargas, J., Sierra, A. y Aceves, J. (1989) The Role of Calcium in the Repetitive Firing of Neostriatal Neurons. Exp. Brain. Res. 75: 157-168.

Galarraga, E., Pacheco-Cano, M. T., Flores-Hernández, J. V. y Bargas, J. (1994). Subthreshold Rectification in Neostriatal Spiny Projection Neurons. Exp. Brain. Res. 100: 239-249.

Gerfen, C. R., Herkenham, M. y Thibault, J. (1987). The Neostriatal Mosaic II. Compartmental Organization of Mesostriatal Dopaminergic and Non-Dopaminergic Systems. J. Neurosci. 7: 3915-3934.

Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W., y Kimura, M. (1994). The Basal Ganglia and Adaptive Motor Control. Science. 265: 1826-1831.

Hass, H. L. (1982). Cholinergic Disinhibition in Hippocampal Slices of the Rat. Brain Res. 233: 200-204.

Hernández-Echegaray, E., Galarraga, E y Bargas, J. (1996). Modulación Colinérgica de las Aferentes Glutamatérgicas al Neostriado. XXXIX. CNCF.

Hernandez-López, S., Bargas, J., Reyes, A. y Galarraga, E. (1996). Dopamine Modulates the Afterhyperpolarization in Neostriatal Neurons. Neuro Report 7: 454-456.

Hille, B. (1984). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Eds. Sunderland, Mass.

Hinrichsen, R. D. (1993). Ca<sup>++</sup> Dependent K<sup>+</sup> Channels: Distribution and Function. En: Molecular Biology Intelligence Unit, Landes, R. G. Ed. U.S.A. pp. 16-23.

Horikawa, K., y Armstrong, W. E. (1988). A Versatile Means of Intracellular Labeling: Injection of Iocytn and its Detection with Avidin Conjugates. J. Neurosci. Methods 25: 1-11.

Jiang, Z. G., y North, R. A. (1991). Membrane Properties and synaptic Responses of Rat Striatal Neurons in vitro. J. Physiol. 443: 533-553.

Kawaguchi, Y. (1992). Receptor Subtypes Involved in Callosally -Induced Postsynaptic Potentials in Rat Frontal Agranular Cortex in Vitro. Exp. Brain Res. 88: 33-40.

Kemp, J. M. y Powell, T. P. S. (1970). The Cortico-Striate Projection in the Monkey. Brain, 97: 525-546.

Kita, T., Kita, H. y Kitai, T. (1984). Passive Electrical Membrane Properties of Rat Neostriatal Neurons in an In Vitro Slice Preparation. Brain Res. 300: 129-139.

Kolb, H. A. (1990). Potassium Channels in Excitable and Non-Excitable Cells. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 115: 51-91.

Ladinsky, H., Consolo, S., Peri, G., Crunelli, V., y Samanin, R. (1977). Pharmacological Evidence for a Serotonergic-cholinergic Link in the Striatum. In: Cholinergic Mechanisms and Psychopharmacology. Edited by Donald J. Jenden. Plenum Press. New York. p. 615-627.

Lancaster, B. y Nicoll, R. A. (1987). Properties of Two Calcium-Activated Hyperpolarizations in Rat Hippocampal Neurons. J. Physiol. 389: 187-204.

Lancaster, B., Nicoll, R. A., y Perkel, D. J. (1991). Calcium Activates two Types of Potassium Channels in Rat Hippocampal Neurons in Culture. J. Neurosci. 11: 23-30.



Levitan, I. B. (1994). Modulation of Ion Channels by Protein Phosphorylation and Dephosphorylation. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 193-212.

Madison, D. V., y Nicoll, R. A. (1984). Control of Repetitive Discharge of Rat CA1 Pyramidal Neurons in Vitro. *J. Physiol.* 354: 319-331.

Madison, D. V y Nicoll, R. A. (1986). Actions of Noradrenaline recorded Intracellularly in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons, in vitro. *J. Physiol.* 372: 221-244.

McGeer, P. L. y McGeer, E. G. (1993). Neurotransmitters and their Receptors in the Basal Ganglia. In: Narabayashi H, Nagatsu T, Yanagisawa N, Mizuno Y, eds. *Advances in Neurology*. 60. New York, Raven Press. 93: 10.

Mc George, A. J. y Faull, R. L. M. (1989). The Organization of the Projection from the Cerebral Cortex to the Striatum in the rat. *Neuroscience*. 29: 503-537.

Mehler, W. R. (1966). Further Notes on the Centre Median Nucleus of Luys. In the Thalamus, ed. Purpura, D. P and Yahr, M. D. ,pp. 109-127. Columbia University Press, New York.

Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., y Phillips, M. (1985). Charibdotoxin a Protein Inhibitor of Single  $Ca^{2+}$  Activates  $K^{+}$  Channels from Mammalian Skeletal Muscle. *Nature*, 313: 316-318.

Miyoshi, R., Kito, S., y Tanaka, A. (1991). Effect of Neurotensin on Dopamine and Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Rat Striatum. In: *The Basal Ganglia III*. Edited by G. Bernardi et al. Plenum Press, New York. p. 371-378.

Muller, W., y Connor, J. A. (1991). Cholinergic Input Uncouples  $Ca^{2+}$  Changes from  $K^{+}$  Conductance Activation and Amplifies Intradendritic  $Ca^{2+}$  Changes in Hippocampal Neurons. *Neuron*. 6: 901-906.

Muller, W., Petrozzino, J. J., Griffith, L. C., Danho, W., y Connor, J. A. (1992). Specific Involvement of  $Ca^{2+}$  Calmodulin Kinase II in Cholinergic Modulation of Neuronal Responsiveness. *J. Neurophysiol.* 68: 2264-2268.

Nicoll, R. A., Malenka, R., y Kaver, J. (1990). Functional Comparison of Neurotransmitter Receptor Subtypes in Mammalian Central Nervous System. *Physiol. Rev.* 70: 2.

Nicholls, J. G., Robert, A., y Bruce, G. W. (1992). *From Neuron to Brain. A Cellular and Molecular Approach to the Function of the Nervous System.* Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, U. S. A.

Nicholls, D. G. (1994). *Proteins, Transmitters and Synapses.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 10: 186-198.

Ohye, C., Shibasaki, T., Hirato, M., Kawashima, Y., Matsumura, M., y Shibasaki, T. (1991). Neural Activity of the Basal Ganglia in Parkinson's Disease Studied by Depth Recording and Pet scan. In: *The Basal Ganglia III.* Edited by G. Bernardi et al. Plenum Press, New York. p. 637-644.

Pasik, P., Pasik, T., y Holstein, G. R. (1989). The Ultrastructural Chemoanatomy of the Basal Ganglia: 1984-1989. *The Basal Ganglia III.* Ed. G. Bernardi et al. Plenum Press, New York.

Pedarzani, P., y Storm, J. F. (1993). PKA Mediates the Effects of Monoamine Transmitters on the K<sup>+</sup> Current Underlying the Slow Spike Frequency Adaptation in Hippocampal Neurons. *Neuron* 11: 1023-1035.

Pineda, J. C., Galarraga, E., Bargas, J., Cristancho, M., y Aceves, J. (1992). Charibdotoxin and Apamin Sensitivity of the Calcium - Dependent Repolarization and the After-Hyperpolarization in Neostriatal Neurons. *J. Neurophysiol.* 68: 327-340.

Pineda, J. C. (1995). El Postpotencial Hiperpolarizante y las corrientes de Potasio en las Neuronas Neoestriatales de la Rata: Un Ejemplo de Modulación colinérgica. Tesis de doctorado. UNAM.

Pineda, J. C., Bargas, J., Flores- Hernandez, J., y Galarraga, E. (1995). Muscarinic Receptors Modulate the Afterhyperpolarizing Potential in Neostriatal Neurons. *J. Pharmacol.*

- Precht, W., y Yoshida, M. (1971). Blockage of Caudate-Evoked Inhibition of Neurons in the Substantia Nigra by Picrotoxin. Brain Res. 32: 229-233.
- Preston, R. J., Bishop, G. A., y Kitai, S. T. (1980). Medium Spiny Neuron Projection from the Rat Striatum: An Intracellular Horseradish Peroxidase Study. Brain Res. 183: 253-263.
- Ribak, C. E., Vaughn, J. E., Saito, K., Barber, R., y Roberts, E. (1976). Immunocytochemical Localization of Glutamate Decarboxylase in Rat Substantia Nigra. Brain. Res. 116: 287-298.
- Rothwell, J. C. (1987). Control of Human Voluntary Movement. Croom Helm. Australia.
- Rudy, B. (1988). Diversity and Ubiquity of K<sup>+</sup> Channels. Neuroscience 25: 729-749.
- Sah, P., y McLachlan, E. M. (1991). Ca<sup>2+</sup>- Activated K<sup>+</sup> Currents Underlying the Afterhyperpolarization in Guinea Pig Vagal Neurons: A Role for Ca<sup>2+</sup> - Activated Ca<sup>2+</sup> release. Neuron. 7: 257-264.
- Sah, P., y McLachlan, E. M. (1992). Potassium Currents Contributing to Action Potential Repolarization and the Afterhyperpolarization in the Rat Vagal Motoneurons. J. Neurophysiol. 68: 1834-1840.
- Sawczuk, A., Randall, K. P., y Marc, D. B. (1995). Spike Frequency Adaptation Studied in Hypoglossal Motoneurons of the Rat. J. Neurophysiol. 73, 5: 1799-1810.
- Scatton, B. (1987). Excitatory Amino Acid and GABA Influence on Rat Striatal Cholinergic Transmission. In: Neurotransmitter Interactions in the Basal Ganglia. Edited by M. Sandler, C. Fenertein, B. Scatton. Raven Press, New York. pp 121-131.
- Schubert, J. (1977). Central Cholinergic Dysfunctions in Man: Clinical Manifestations and Approaches to Diagnosis and Treatment. In: Cholinergic Mechanisms and Psychopharmacology. Edited by Donald J. Jenden. Plenum Press. New York. p. 733-753.

Somogyi, P., Bolam, J. P. y Smith. A. D. (1981). Monosynaptic Cortical Input and Local Axon Collaterals of Identified Striatonigral Neurons. A Light and Electron Microscopic Study Using the Golgi- Peroxidase Transport-Degeneration Procedure. *Comp Neurol* 195: 567-584.

Storm, J. F. (1987). Action Potential Repolarization and a Fast After-Hyperpolarization in Rat Hippocampal Pyramidal Cells. *J. Physiol.* 385: 733-759.

Storm, J. F. (1989). An After-hyperpolarization of Medium Duration in Rat Hippocampal Pyramidal Cells. *J. Physiol.* 409: 171-190.

Tarsy, D. (1979). Interactions Between Acetylcholine and Dopamine in the Basal Ganglia. In: *Brain Acetylcholine and Neuropsychiatric Disease*. Edited by Kenneth, L. D., and Berger, P. A. Plenum Pres, New York. p. 395-424.

Vilchis, C., Glarraga, E., Ayala, X. y Bargas, J. (1996). Modulación Colinérgica de las Corrientes de Potasio Dependientes de Calcio de las Neuronas neostriatales de Proyección. XXXIX CNCF.

Wilson, C. J. (1990). Basal Ganglia. In: Shepherd G, M. (ed). *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, Oxford.

Wilson, C. J., Chang, H. T., y Kitai, S. T. (1990). Firing Patterns and Sympatic Potentials of Identified Giant Aspiny Interneurons in the Rat Neostriatum. *J. Neurosci.* 10 (2): 508-519.

Wilson, C. J. (1994). The contribution of Cortical Neurons to the Firing Pattern of Striatal Spiny Neurons. In: *Models of Information Processing in the Basal Ganglia*, edited by J. C. Houk, J. L. Davies, and D. G. Beiser, Cambridge MA: MIT Press, p. 29-50.

Weiler, M. H., Misgeld, U. y Cheong, D. K. (1984). Presynaptic Muscarinic Modulation of Nicotinic Exitation in the Rat Neostriatum. *Brain Res.* 296: 111-120.