

1102EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“MODULACION PRESINAPTICA DE LAS AFERENTES GLUTAMATERGICAS AL NEOESTRIADO DE LA RATA POR ACTIVACION DE LOS RECEPTORES GABA_B”

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 :

SILVIA TORO BADILLO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE BARGAS DIAZ

28/3/99



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON FALLA EN COPIEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

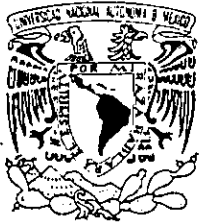


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas al
neocórtex de la rata por activación de los receptores GABA_B"

realizado por Silvia Toro Badillo.

con número de cuenta 9026175-8, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. José Bargas Díaz

Propietario Dra. Hortensia González Gómez

Propietario Dra. Ma. Eugenia Gensebatt Bonaparte

Suplente Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Suplente Biol. José Fernando Peña Ortega

José Bargas
Hortensia González
Eugenia Gensebatt
Silvestre de Jesús
José Fernando Peña

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de BIOLOGÍA

COORDINADORA DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica en el laboratorio 125-Norte del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz.

Agradezco al Dr. José Bargas Díaz por su asesoría y apoyo en la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado por su revisión y sugerencias

Dra. Hortensia González Gómez

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Biol. José Fernando Peña Ortega

ÍNDICE

RESUMEN

I INTRODUCCIÓN

A. Los Ganglios Basales	8
Aferencias y eferencias de los ganglios basales	8
B. Elementos neuronales del neostriado	10
Neuronas principales	10
Interneuronas	10
C. Modulación de la transmisión sináptica	11
Modulación presináptica	15
Mecanismos de modulación presináptica	15
D. Canales de calcio	16
Clasificación	16
Voltaje de activación e inactivación	17
Sensibilidad a antagonistas	17
Estructura molecular de los canales de Ca^{2+}	19
El calcio y la liberación del neurotransmisor	20
Modulación presináptica de los canales de Ca^{2+}	20
E. El ácido Gamma-Aminobutírico (GABA)	22
Metabolismo del GABA	22
F. Receptores GABAérgicos	24
Receptor $GABA_A$	24
Receptor $GABA_B$	25
Estructura molecular	28

Modulación presináptica por activación del receptor GABA _B	29
Receptor GABA _C	31
G. El Potencial de Campo	31
Componentes sinápticos poblacionales del neostriado	35
II HIPÓTESIS	36
III OBJETIVO	36
IV MÉTODO	37
A. Obtención de las rebanadas	37
B. Registro electrofisiológico	37
C. Protocolo experimental	39
Facilitación por pulsos pareados	39
D. Análisis de datos	43
V RESULTADOS.	45
A. Bloqueo del efecto de baclofen por saclofen, antagonista selectivo del receptor GABA_B	45
B. Curva dosis-respuesta de la acción presináptica del baclofen, agonista del receptor GABA_B	46
C. El baclofen no actúa sobre los canales de Ca²⁺ tipo N y P en las aferentes glutamatérgicas al neostriado	49
D. Participación de los canales de Ca²⁺ tipo Q en la modulación del receptor GABA_B en las aferentes glutamatérgicas al neostriado	54
E. Resumen del bloqueo del efecto inhibitorio de baclofen por antagonistas de canales de Ca²⁺	54
VI DISCUSIÓN	58

VII CONCLUSIÓN	66
VIII ANEXO		
Lista de abreviaturas.....		67
IX REFERENCIAS	69

RESUMEN

Las fibras aferentes que proyectan al neostriado liberan glutamato. Las corrientes de Ca^{2+} tipo P/Q y N participan en esta liberación. Estos canales pueden ser modulados por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) a través de la activación presináptica del receptor GABA_B . Lo que produce una disminución en la liberación de glutamato a través de la activación de proteínas G.

Para determinar que canales de Ca^{2+} son modulados presinápticamente por GABA a través de la activación del receptor GABA_B , se realizaron registros poblacionales en rebanas de cerebro de rata. Se utilizó el protocolo de Facilitación por Pulsos Pareados (FPP), el cual evalúa la inhibición presináptica producida por un neuromodulador.

El presente trabajo demuestra que el baclofen, agonista del receptor GABA_B , incrementa la facilitación sináptica en las aferentes glutamatérgicas al neostriado, de manera dependiente de la concentración. La EC_{50} es de $0.57 \mu\text{M}$ y el efecto máximo de 457%. Los antagonistas selectivos de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N, incrementan la FPP, lo que confirma su participación en la liberación del neurotransmisor. Los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tipo N y P, $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ ($1\mu\text{M}$) y la $\omega\text{-AgTx-TK}$ (20 nM) respectivamente, no bloquearon el incremento en la FPP producido por baclofen, lo que sugiere que estos canales no son modulados por la activación del receptor GABA_B . A concentraciones suficientes para empezar a bloquear los canales de Ca^{2+} tipo Q, la $\omega\text{-AgTx-TK}$ (50 nM), bloqueó parcialmente el efecto de baclofen sobre la FPP.

A una concentración de 400 nM de $\omega\text{-AgTx-TK}$ se ocluye casi totalmente el incremento de la facilitación sináptica producida por baclofen. Esto sugiere que la activación del receptor GABA_B en las aferentes neostriatales inhibe la liberación del neurotransmisor glutamato a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} .

I INTRODUCCIÓN

A. LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son núcleos del cerebro medio y anterior de los vertebrados. Están constituidos por los núcleos caudado (Cd), putamen (Put), acumbens, globo pálido externo, globo pálido interno, globo pálido ventral (GPe, GPi, GPv), el núcleo subtalámico (STN), la substancia nigra pars reticulata, la substancia nigra pars compacta (SNr, SNc) y los núcleos pedúnculo pontinos (PPN).

La disfunción de los ganglios basales está relacionada con algunas enfermedades degenerativas que producen alteraciones en los movimientos voluntarios, entre ellas se encuentran la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourett, las diskinesias y la corea de Huntington (Lovinger y Tyler, 1996; Wilson, 1998).

Las estructuras que reciben las aferentes a los ganglios basales son el núcleo caudado y el putamen, los cuales constituyen el **neostriado**. En algunos mamíferos como la rata es una sola estructura, pero en otros consta de 2 porciones, el caudado medial y el putamen lateral divididos por las fibras de la cápsula interna (Albin, et al., 1989).

AFERENCIAS Y EFERENCIAS DE LOS GANGLIOS BASALES

El neostriado recibe entradas glutamatérgicas de áreas de asociación, sensoriales y motoras de la corteza cerebral, presentando una regionalización topográfica que determina su organización anatómica y funcional (Alexander, et al., 1986). Adicionalmente recibe entradas glutamatérgicas de los núcleos centromediano y parafascicular del tálamo (Sadikot, et al., 1990), dopaminérgicas de la SNc, serotoninérgicas de los núcleos del rafé y del núcleo basolateral de la amígdala. También presenta aferentes GABAérgicas del GPe (Graybiel y Ragsdale, 1983). Al núcleo acumbens convergen entradas de la corteza límbica y del hipocampo.

Los axones de la corteza cerebral y del tálamo forman sinapsis principalmente sobre las espinas dendríticas de las neuronas principales. Se ha establecido que el neurotransmisor de las aferentes al neostriado de los núcleos intralaminares del tálamo y de la vía corticoestriatal es el glutamato (Parent, 1990; Lovinger y Tyler, 1996).

La figura 1 muestra que los principales núcleos a donde proyecta el neostriado son: el GPe, el GPi y la SNr. El GPe proyecta principalmente al STN. El GPi y la SNr proyectan a estructuras externas de los ganglios basales, proporcionando el principal camino de salida de las operaciones neuronales efectuadas en estos núcleos. Sus núcleos blanco son principalmente los núcleos ventrales del tálamo, que proyectan a la corteza frontal. También lo son la habénula lateral, la capa profunda del colículo superior y los núcleos pedúnculo pontinos.

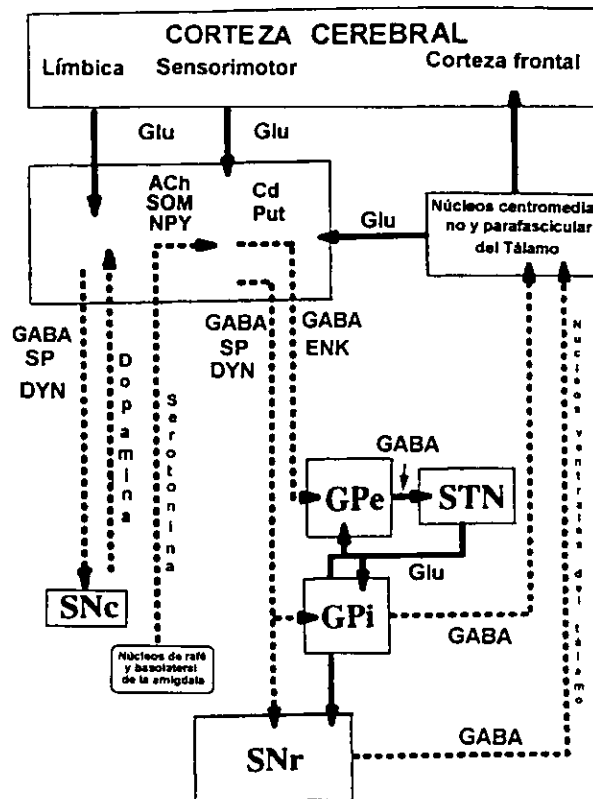


Figura 1. Diagrama que muestra las conexiones entre los diferentes núcleos de los ganglios basales y los neurotransmisores utilizados (Modificado del Lovinger y Tyler, 1996) (Ver lista de abreviaturas).

B. ELEMENTOS NEURONALES DEL NEOESTRIADO

NEURONAS PRINCIPALES

Las neuronas principales del neocóstriado constituyen del 91-94% de la población neuronal (Chang, et al., 1982). Se conocen como "neuronas espinosas medianas" (DiFiglia, et al., 1976) por la gran densidad de espinas dendríticas que presentan, la cual es una de las mayores encontradas en el cerebro. Tienen un soma con un diámetro de 12-18 μm , del cual surge un pequeño número de troncos dendríticos. Presentan de 25 a 30 ramas terminales dendríticas que irradian en todas direcciones dando un volumen cuasiesférico con un diámetro de 300-500 μm . El axón se origina en el soma o en un tronco dendrítico proximal, dando arborizaciones locales antes de alejarse del soma (Wilson, 1998).

Estas neuronas sintetizan y liberan el ácido gamma-aminobutírico (GABA) por lo que sus botones terminales son inhibitorios (Precht y Yoshida, 1971). Una gran proporción de sus sinapsis es sobre las espinas dendríticas de otras neuronas espinosas (Kita, et al., 1990), por lo que se asume que ejercen inhibición entre ellas (Park, et al., 1980). Además, se han localizado varios neuropeptidos como: sustancia P (SP), encefalinas (ENK) y dinorfina (DYN), los cuales presentan una distribución específica según el núcleo al que proyectan. Las ENK están en altas concentraciones en neuronas que proyectan al GPe; la SP y la DYN en neuronas que proyectan a la SNr.

INTERNEURONAS

Estudios anatómicos en el neocóstriado muestran una diversidad morfológica de neuronas sin espinas que no proyectan su axón fuera del neocóstriado, y constituyen un pequeño porcentaje del total de la población neocóstriatal; 3 tipos han sido categorizadas funcional y estructuralmente.

Las interneuronas colinérgicas representan menos del 2% de la población neocortical y fueron identificadas por la presencia de colina acetiltransferasa (ChAT) (Bolam, et al., 1984). Presentan un soma alargado de diámetro mayor a 50-60 μm de longitud y menor de 15-25 μm . Las dendritas distales presentan apéndices y varicosidades.

Estas neuronas son pocas en número, pero su arborización axonal es grande y densa, dando una rica inervación colinérgica al neocórtex y ejerciendo una gran influencia en el disparo de las neuronas espinosas medianas.

Las interneuronas GABAérgicas representan del 3-5% de la población neuronal. Se distinguen de las neuronas espinosas de proyección por la presencia de la parvalbúmina, proteína intracelular que amortigua Ca^{2+} (Kita, et al., 1990), y por su alta concentración de GABA. Presentan un soma con un tamaño similar al de las neuronas de proyección, tienen dendritas varicosas y una extensa arborización axonal y dendrítica.

Las interneuronas que contienen somatostatina/óxido nítrico (NO) representan 1-2 % de la población neuronal del neocórtex, tienen pocas ramas dendríticas sin espinas y un extenso campo axonal. Estas interneuronas liberan somatostatina, neuropeptido Y (NPY), NO y GABA (Kawaguchi, et al., 1995).

C. MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

La sinapsis es la zona de contacto específico que se establece entre las neuronas para transmitir la información neuronal, la cual puede ser eléctrica o química.

La transmisión sináptica se inicia con la llegada de un potencial de acción en la terminal presináptica, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se abren por la despolarización e incrementan la concentración del Ca^{2+} intraterminal (Charlton, et al., 1982; Matthews, 1996). Esto provoca la exocitosis de moléculas transmisoras que se unen a un sitio de reconocimiento específico en la neurona postsináptica, provocando diversas

reacciones celulares dependientes del neurotransmisor y la neurona involucrada (Stanley, 1997; Fossier, et al., 1999). En la figura 2 se muestra una sinápsis química.

La modulación de las propiedades de los canales iónicos de membrana es importante para la regulación de la actividad eléctrica neuronal. La neuromodulación generalmente actúa a través de proteínas G y otras vías de señalización intracelular que reconfiguran las respuestas neuronales por reducción o incremento de las conductancias iónicas (Bargas y Galarraga, 1995).

Las proteínas G (proteínas que unen GTP) presentan una estructura heterotrimérica compuesta por las subunidades α , β y γ , (Mr 40K, 32K y 8K respectivamente) (De Waard, et al., 1997). Estas proteínas envían las señales que reciben a efectores intracelulares, los cuales inducen un cambio en la concentración de segundos mensajeros como: el AMPc, el Ca^{2+} , el fosfato de inositol y diacilglicerol.

La unión del agonista al receptor de membrana acoplado a proteínas G, produce el intercambio del guanosin difosfato (GDP) por guanosin trifosfato (GTP) en la subunidad $G\alpha$, la cual se disocia del heterodímero $G\beta\gamma$. Este reemplazo permite que el GTP unido a subunidad α y el heterodímero $\beta\gamma$ puedan regular la actividad de sus respectivos efectores (Ford, et al., 1998).

La hidrólisis de GTP a GDP realizada por la actividad GTPasa de la subunidad α , permite que esta subunidad se reasocie nuevamente con el heterodímero $\beta\gamma$, y de esta manera se termina la transmisión de señales.

Los efectores del complejo $G\beta\gamma$ incluyen la fosfolipasa A_2 , la adenilato ciclasa, canales iónicos, proteínas cinasas etc. (Brown, 1993)(Figura 3). La subunidad $G\alpha$ puede competir con los efectores de las subunidades $G\beta\gamma$, lo que sugiere una interacción común.

Transmisión sináptica

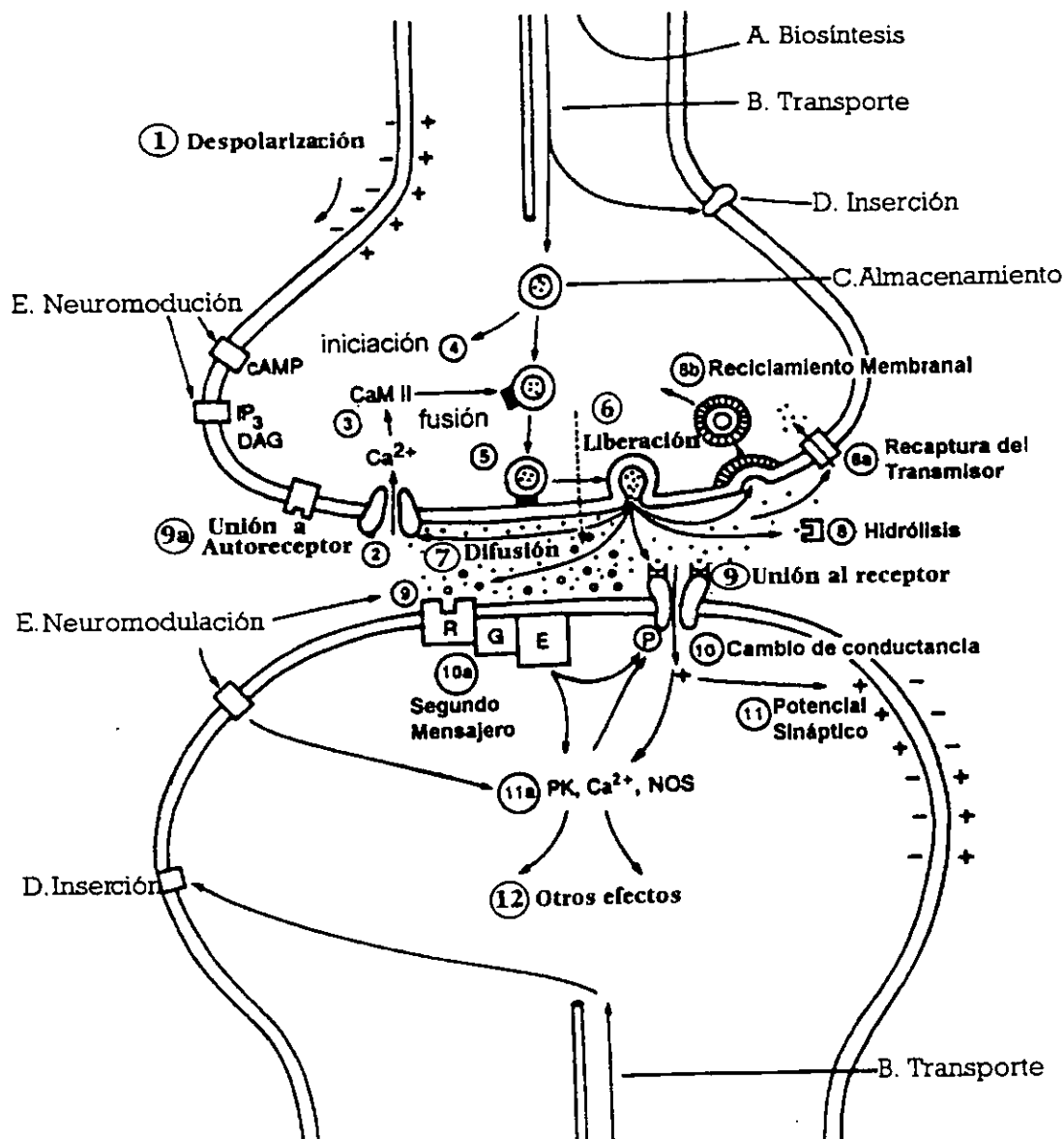


Figura 2. Sinapsis química: A-E describen procesos sinápticos que incluyen la síntesis, transporte y almacenamiento de neurotransmisores y neuromoduladores. 1 al 12 señalan procesos que participan en la transmisión de señales. IP₃, inositol trifosfato; CaM II, proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺/Calmodulina; DG, diacilglicerol; PK, proteína cinasa; R, receptor; G, proteína G; AC, adenilato ciclasa (Sheperd, 1998).

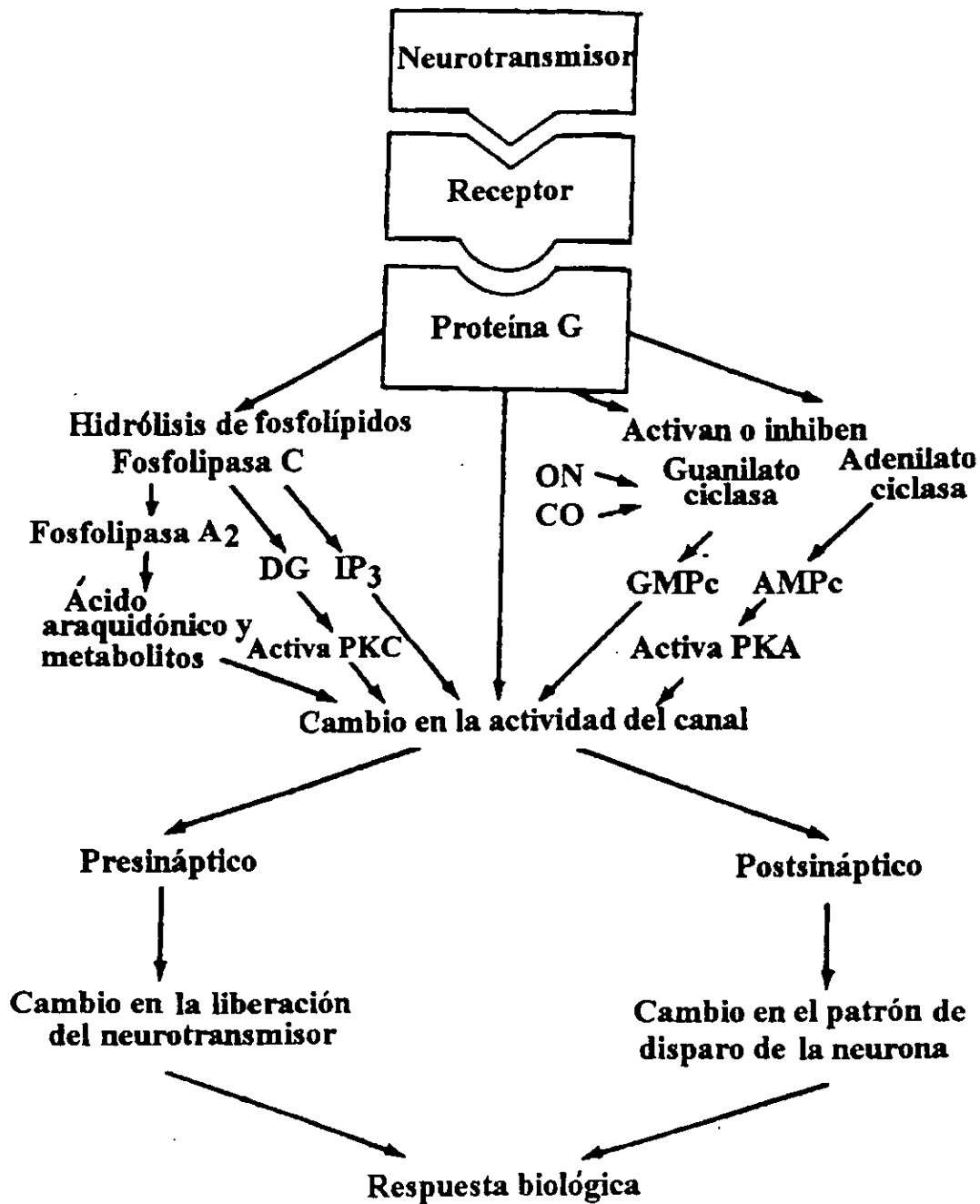


Figura 3. Diagrama que muestra diversas vías de modulación en la transmisión sináptica. DG, diacilglicerol; IP₃, inositol trifosfato; ON, óxido nítrico; CO, monóxido de carbono; AMPc, AMP cíclico; GMPc, GMP cíclico, PKC, proteína cinasa C; PKA, proteína cinasa A (Modificado de Cooper, 1996).

MODULACIÓN PRESINÁPTICA

Se puede modular la liberación del neurotransmisor que depende de Ca^{2+} , a través de autorreceptores o heterorreceptores situados en la terminal sináptica. Los primeros se activan por transmisores liberados en la misma terminal y los heterorreceptores son aquellos que se activan por un transmisor liberado por otra neurona.

Existen varios autorreceptores reconocidos como son: para la noradrenalina el α_2 ; para la dopamina los D_2 y los D_3 ; para la acetilcolina el M_2 y el M_3 ; para el GABA el receptor GABA_B ; para la histamina el receptor H_3 ; para la serotonina el receptor 5-HT_{1D} en el humano y el receptor 5-HT_{1B} en el roedor (Langer, 1997; Miller, 1998).

Se puede modular la liberación sináptica por las siguientes vías: a) incremento de la conductancia de K^+ en la terminal presináptica; b) la regulación de las proteínas involucradas en la liberación del neurotransmisor c) la regulación de la entrada de Ca^{2+} en la terminal presináptica (Miller, 1998).

MECANISMOS DE MODULACIÓN PRESINÁPTICA

La modulación presináptica de los canales de potasio consiste en activar conductancias de K^+ , por ejemplo de rectificación entrante de la familia de los GIRK u otros tipos de canal de K^+ , a través de receptores acoplados a proteínas G (Mintz, et al., 1995; Huang, et al., 1995; Chuang, et al., 1997). Al aumentar la conductancia del ion K^+ se disminuye la duración y amplitud del potencial de acción en la terminal sináptica. Por lo tanto, la despolarización en la terminal es menos efectiva, ya que menos canales de Ca^{2+} se abren y en consecuencia menor cantidad de neurotransmisor es liberado (Graham y Redman, 1994).

La modulación presináptica a través de la maquinaria de liberación consiste en activar receptores presinápticos que modulan ciertos componentes de la maquinaria de

liberación, alterando las propiedades de una o más proteínas involucradas y por tanto inhibiendo la liberación del neurotransmisor. Se ha mostrado que la aplicación de Cd^{2+} , bloqueador de los canales de Ca^{2+} , no afecta la frecuencia de liberación espontánea, lo que indica que la maquinaria de liberación puede ser independiente de la activación de canales de Ca^{2+} (Wu y Saggau, 1997). Asimismo, el baclofen agonista del receptor GABA_B , puede suprimir la frecuencia de corrientes sinápticas espontáneas miniatura de manera independiente de Ca^{2+} (Scanziani, et al., 1992; Rohrbacher, et al., 1997).

Modulación presináptica a través de canales de Ca^{2+} . Se ha mostrado que la activación de receptores que se unen a proteínas G producen una disminución en las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje, al cambiar las propiedades de estos canales.

Las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G son las que transducen esta señal mediante su unión al dominio I y II de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} (Ikeda, 1996; Herlitze, et al., 1996).

Considerando que la modulación presináptica de los canales de Ca^{2+} es el mecanismo más frecuente para inhibir la liberación del neurotransmisor que depende de Ca^{2+} , a continuación se describen las características principales de estos canales.

D. CANALES DE CALCIO

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje están presentes en todas las células excitables y regulan procesos fisiológicos como: transcripción de genes, contracción muscular, neurotransmisión, liberación de hormonas, activación e inactivación de canales iónicos etc. (Hille, 1992).

CLASIFICACIÓN

La expresión de diferentes genes forma subtipos de canal de Ca^{2+} con diferentes propiedades biofísicas, distribución, modulación y sensibilidad farmacológica (Miljanich y

Ramachandran, 1995). La siguiente clasificación es en base al voltaje de activación e inactivación y a su sensibilidad farmacológica.

VOLTAJE DE ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN

Los canales de Ca^{2+} que se activan a voltajes de -70 a -50 mV, son llamados de bajo umbral (LVA) y se les conoce como canales de Ca^{2+} tipo T por su corriente transitoria (Perez-Reyes, et al., 1998). Son sensibles a Ni^{2+} y Co^{2+} . Están implicados en las propiedades de disparo de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) (White, et al., 1989; Zhang, et al., 1993), en la actividad de marcapaso, en las espigas de Ca^{2+} de bajo umbral etc. (Huguenard, 1996). Estos canales se inactivan rápidamente y de manera dependiente al voltaje con un constante de tiempo (τ) de 10 a 40 ms (Carbone y Swandulla, 1989).

En los canales de Ca^{2+} de alto umbral (HVA), el voltaje que los activa varía según el tipo de célula, pero en general las corrientes se activan a voltajes entre -50 y -20 mV, e incluyen los subtipos N, L, P, Q y R, los cuales son bloqueados con Cd^{2+} (50-200 μM) (Miller, 1992; Randall y Tsien, 1995; Mermelstein y Surmeier, 1997; Manira y Bussières, 1997). Estos canales son muy permeables al Ba^{2+} , incluso en mayor proporción que el Ca^{2+} (Hess, 1990), y se inactivan lentamente (una τ mayor de 50 ms) de manera dependiente del Ca^{2+} y/o del voltaje (Carbone y Swandulla, 1989).

SENSIBILIDAD A ANTAGONISTAS

Las toxinas secretadas por ciertos organismos han permitido clasificar farmacológicamente los diferentes tipos de canal de Ca^{2+} activados por voltaje (Adams y Olivera, 1994).

Los canales de Ca^{2+} tipo P fueron identificados en neuronas granulares y de Purkinje de cerebelo donde constituyen el 90% de la corriente de Ca^{2+} (Regan, 1991; Mintz, et

al., 1992a; Randall y Tsien, 1995). Se caracterizan por no presentar sensibilidad a la ω -CgTx-GVIA ni a las dihidropiridinas. Estos canales son bloqueados selectivamente por las toxinas ω -Agatoxina-IVA (ω -AgTx-IVA) (Mintz, et al., 1992b) y ω -Agatoxina-TK (conocida también como ω -AgTx-IVB), ambas obtenidas del veneno de la araña americana *Agelenopsis aperta*. Estas toxinas son péptidos de bajo peso molecular de 48 aminoácidos (Adams, et al., 1993; Kuwada, et al., 1994; Teramoto, et al., 1995). Se ha reportado una concentración de 30 nM de ω -AgTx-TK para inhibir totalmente estos canales, los cuales presentan una alta afinidad por estas toxinas y un bajo desbloqueo durante el lavado (Mintz, et al., 1992ab; Teramoto, et al., 1995).

Los canales de Ca^{2+} tipo Q fueron identificados en neuronas de Purkinje de cerebelo. Se distinguen de los canales de Ca^{2+} tipo P por su menor sensibilidad a ω -AgTx-TK (EC_{50} 90 nM) por su rápida cinética de inactivación y por su alta afinidad a ω -Conotoxina-MVIIC. Se requiere una concentración de 400 nM a 1 μ M de ω -AgTx-TK para bloquear totalmente estos canales (Randall y Tsien, 1995; Teramoto, et al., 1997).

Los canales de Ca^{2+} tipo N son bloqueados por el péptido ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTx-GVIA), purificado del gasterópodo marino *Conus geographus*; consta de 27 aminoácidos (Feldman, et al., 1987).

Esta toxina disminuye la corriente de Ca^{2+} tipo N de manera dependiente de la concentración, reportándose una concentración saturante para bloquear estos canales de 1 μ M (Boland, et al., 1994; Wall y Dale, 1994; Manira y Bussières, 1997). En neuronas neostriatales el bloqueo por esta toxina es parcialmente reversible por el lavado (Bargas, et al., 1994).

Los canales de Ca^{2+} tipo L son bloqueados selectivamente por las dihidropiridinas, tales como nifedipina (10 μ M), nimodipina (5-10 μ M) y por el péptido calciceptina que es

obtenido del veneno del ofidio *Dendroaspis polylepsis polylepsis*; consta de 60 aminoácidos (Regan, 1991; DeWelle, et al., 1991).

ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CANALES DE Ca^{2+}

La biología molecular de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje se inicia con la clonación de la subunidad α_{1S} del receptor a dihidropiridinas del músculo esquelético (Pérez-Reyes y Schneider, 1995).

Estudios bioquímicos han mostrado que los canales de Ca^{2+} neuronales son un complejo compuesto por las subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$ y β , (Mermelstein y Surmeier, 1997; Zamponi y Snutch, 1998), cada subunidad está compuesta por cuatro dominios (I al IV), cada uno con seis regiones transmembranales (S1 a S6). La región S4 tiene lisinas y argininas que le dan una carga positiva, por lo que se postula que forma parte del censor del voltaje (Tanabe, et al., 1987). La subunidad α_1 forma el poro del canal de Ca^{2+} (De Waard, et al., 1997; Namkung, et al., 1998) y muestra una gran selectividad por unir este catión al presentar cuatro residuos de glutamato con cargas negativas. Los agentes farmacológicos se unen a esta subunidad (Snutch y Reiner, 1992).

Por clonación molecular se han identificado 9 genes para la subunidad α_1 (α_{1A} - α_{1H} y α_{1S}); 4 para la subunidad β (β_1 - β_4) y un gen para la subunidad $\alpha_2\delta$ (Birnbaumer, et al., 1994; Pérez-Reyes, et al., 1998). La subunidad γ se encuentra sólo en ciertos canales. La subunidad α_{1A} corresponde a los canales de Ca^{2+} tipo P y Q; la subunidad α_{1B} al tipo N; α_{1C} , α_{1D} y α_{1S} son subunidades del tipo L (α_{1C} cerebro, músculo liso y cardiaco; α_{1D} cerebro, sistema endocrino y riñón, α_{1S} músculo esquelético) (Dunlap, et al., 1995), la subunidad α_{1E} corresponde al canal de Ca^{2+} tipo R (Zamponi y Snutch, 1998). Más recientemente se han identificado las subunidades α_{1G} , α_{1H} y el α_{1I} para las diferentes isoformas de canal de Ca^{2+} tipo T (Pérez-Reyes, 1998).

EL CALCIO Y LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que participan en la liberación del neurotransmisor en las neuronas, son los tipos P, Q y N, ya que los L sólo tienen una pequeña contribución en el proceso (Bourinet, et al., 1996; Zhang, et al., 1996; Bargas, et al., 1998).

La exocitosis del neurotransmisor ocurre en zonas donde están las vesículas sinápticas (VS) y para que se lleve a cabo se forma un complejo de proteínas de la membrana plasmática (syntaxina y SNAP-25) y de la VS (sinaptobrevina y VAM) (Stanley, 1997), además de otras proteínas como las Rab (Gorvel, et al., 1991; Stahi, et al., 1994; Li, et al., 1994).

Se ha mostrado que las toxinas botulínicas y tetánicas inhiben la exocitosis, ya que digieren específicamente a la sinaptobrevina, a la SNAP-25 y a la syntaxina, lo que demuestra que la formación del complejo es esencial para la liberación del neurotransmisor (Südhof, 1995).

La sinaptotagmina es una proteína de la VS que actúa como un sensor de Ca^{2+} en el sitio de la exocitosis (Davletov y Südhof, 1994). Después de la exocitosis, la membrana de la VS es reciclada por endocitosis, proceso que es dependiente de Ca^{2+} extracelular (Ceccarelli y Hurlbut, 1980; De Camilli y Takei, 1996).

MODULACIÓN PRESINÁPTICA DE LOS CANALES Ca^{2+}

La inhibición de canales de Ca^{2+} mediada por receptor se lleva a cabo por la interacción del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G con la primera asa intracelular que conecta los dominios I y II de las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} del canal de Ca^{2+} (Dunlap, 1995; Dolphin, 1995; Herlitze, et al., 1996; Ikeda, 1996; Wu y Saggau, 1997). Las subunidades α_{1s}

α_{1D} y α_{1S} no son moduladas directamente por proteínas G (Toth, et al., 1996; Zhang, et al., 1996; De Waard, et al., 1997).

La unión citoplásmica de los dominios I y II de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} , presenta un dominio de interacción con una secuencia de 18 aminoácidos, de los cuales 9 residuos son universalmente conservados (QQ-E--L-GY--WI---E) y son el sitio de unión de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G (De Waard, et al., 1997) (Figura 4).

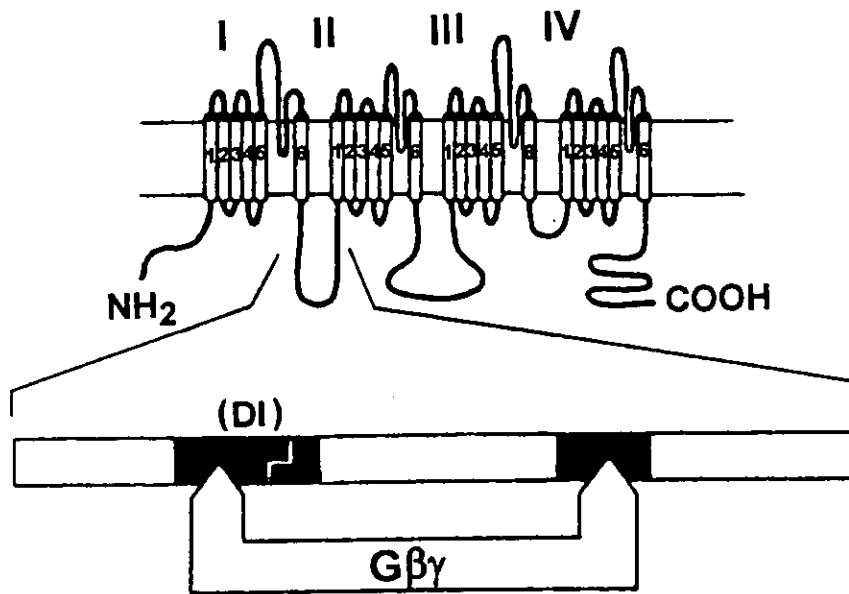


Figura 4. Sitio de interacción del complejo $G\beta\gamma$ con la primera asa intracelular que une los dominios I-II de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} (DI, dominio de interacción) (Modificado de De Waard, et al., 1997).

Se sugiere que la subunidad β_3 de los canales de Ca^{2+} antagoniza la acción de las proteínas G, ya que interactúa con los sitios de unión de los dominios I y II de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} (Pragnell, et al., 1994; Bourinet, et al., 1996). Sin embargo, se ha reportado que el carboxilo terminal y otras regiones específicas del dominio I de los canales de Ca^{2+} también contribuyen a la unión $G\beta\gamma$ (Zhang, et al., 1996; Quin, et al., 1997). Por ejemplo, una mutación en los residuos de arginina en el dominio amino-terminal puede

desaparecer la unión del canal de Ca^{2+} con las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G (De Waard , et al., 1997).

En neuronas ganglionares de ratón la delección de la subunidad β_3 del canal de Ca^{2+} disminuye las corrientes de Ca^{2+} tipo N y L y altera la activación voltaje-dependiente de las corrientes de Ca^{2+} tipo P y Q, lo cual indica la participación de otras subunidades del canal de Ca^{2+} en la modulación por proteínas G (Namkung , et al., 1998).

E. EL ÁCIDO GAMMA-AMINOBUTÍRICO (GABA)

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante del SNC de la mayoría de los organismos vivos (Sivilotti y Nistri, 1991; Perkinson y Sihra, 1998). La mitad de todos los botones presinápticos cerebrales contienen GABA (Chen G y Van den Pol, 1998). Su concentración basal en varias regiones del SNC está en el orden de $\mu\text{moles/g}$.

METABOLISMO DEL GABA

La glucosa es el principal precursor para la síntesis del GABA en el cerebro de los mamíferos, sin embargo, el piruvato y algunos aminoácidos pueden, por medio de su incorporación al ciclo de Krebs, servir como precursores.

El metabolismo del GABA se inicia con la transaminación del α -cetoglutarato a glutamato, por la GABA transaminasa (GABA-T). El glutamato es descarboxilado por la enzima glutamato descarboxilaza (GAD), para formar GABA. Posteriormente, el GABA es transaminado para formar semialdehído succínico por la enzima GABA-T, esta última reacción ocurre cuando el α -cetoglutarato es el aceptor del grupo amino para convertirse de esta manera en glutamato. El semialdehído succínico producido a partir de GABA, puede ser oxidado en ácido succínico por la deshidrogenasa del semialdehído succínico (DHSAS) y entrar el ciclo de Krebs (Figura 5).

En la figura 6 se muestra otra vía para la formación de GABA, "La ruta de la glutamina", en la cual el GABA liberado es capturado por las células gliales donde se transamina por medio de la GABA-T para producir glutamato. Éste no puede ser convertido a GABA en la glia, ya que estas células carecen de la GAD. Pero, el glutamato es transformado en glutamina por la enzima glutamato sintetasa (GluSint) y es devuelto a la terminal nerviosa

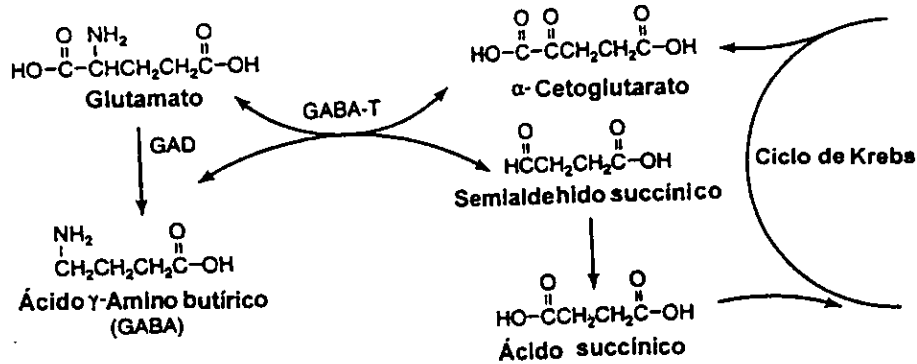


Figura 5. Metabolismo del GABA (Siegel, et al., 1994).

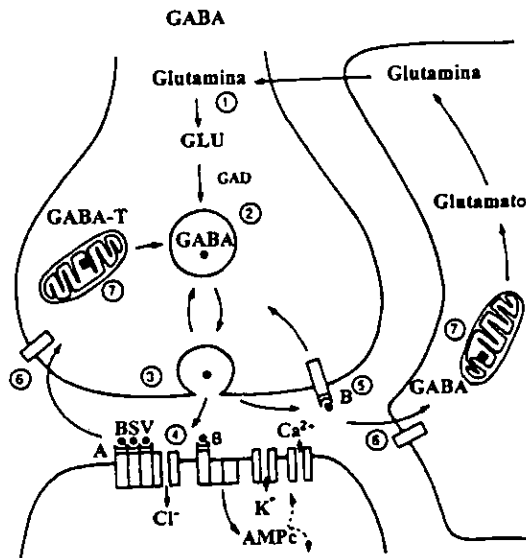


Figura 6. Mecanismo molecular de la sinapsis GABAérgica. 1) Síntesis del GABA por glutamina (catalizada por GAD); 2) transporte y almacenamiento del GABA; 3) liberación del GABA por exocitosis; 4) unión del receptor GABA_A que es bloqueado por bicuculina (B), picrotoxina (S), y modulado por benzodiazepinas. En contraste, el receptor GABA_B, está unido vía proteínas G a canales de Ca²⁺ y K⁺ 5) unión al receptor presináptico; 6) recaptura en la terminal presináptica y por la glia; 7) transaminación del GABA a α -cetoglutarato (catalizada por GABA-T), regeneración del glutamato a glutamina (Modificada de Cooper et al., 1993).

donde la enzima glutaminasa la convierte nuevamente en glutamato (Timothy, et al., 1994; Cooper, et al., 1996).

F. RECEPTORES GABAérgicos

Se da el término de "receptor GABAérgico" al sitio de reconocimiento del GABA o a sus agonistas específicos en la membrana pre o postsináptica. Los receptores de GABA están principalmente en la membrana de las neuronas del SNC, pero también se expresan en el sistema nervioso autónomo y periférico (SNA P), y en astrocitos, donde regulan canales de Cl^- (Cooper, et al., 1996). Estudios bioquímicos, electrofisiológicos y farmacológicos han clasificado a los receptores GABA en: GABA_A (GABA_{A1} , GABA_{A2}), GABA_B y GABA_C .

RECEPTOR GABA_A

El receptor GABA_A es una glicoproteína de aproximadamente 275 kd. Está formado por una combinación de subunidades polipeptídicas (α , β , γ , δ). La agrupación de estas subunidades presentan un canal de Cl^- , el cual al unir el ligando incrementa su conductancia, produciendo la inhibición postsináptica rápida (Perkinton y Sihra, 1998). Este receptor tiene una localización principalmente somática (Sivilotti y Nistri, 1991).

El receptor GABA_A presenta múltiples sitios de interacción con ligandos, incluyendo sitios para picrotoxina/barbitúricos, para benzodiazepinas y para esteroides, los cuales modulan la respuesta del receptor a la activación por GABA. Las benzodiazepinas facilitan la acción del GABA al incrementar la frecuencia de apertura del canal de Cl^- . Los barbitúricos prolongan la duración de apertura del receptor canal. También el etanol y la penicilina tienen efectos sobre este receptor (Suzdak, et al., 1986).

Diversos estudios sugieren que existen al menos dos sitios de reconocimiento al GABA dentro del receptor, uno de alta afinidad, marcado con muscimol, asociado con el sitio de unión a GABA (en la subunidad β), y uno de baja afinidad, marcado con bicuculina,

relacionado con el sitio de unión a benzodiazepinas (en la subunidad α). Los agonistas del receptor GABA_A incrementan la permeabilidad de la membrana al Cl⁻ y sus antagonistas bloquean o reducen la conductancia a este ión. El clásico antagonista competitivo del receptor GABA_A es la bicuculina, que reduce la frecuencia y el tiempo de apertura del canal de Cl⁻.

La inhibición postsináptica debida al receptor GABA_A ocurre cuando el GABA o un agonista específico se une al receptor postsináptico provocando la apertura del canal-receptor de Cl⁻. La entrada de iones Cl⁻ a la célula hiperpolariza la membrana plasmática respecto al umbral de disparo, disminuyendo el efecto despolarizante de las entradas excitatorias.

La inhibición presináptica se realiza cuando una neurona GABAérgica inhibe la liberación de neurotransmisores excitadores, debido a que la terminal que libera estos posee receptores a GABA, generalmente del tipo GABA_B.

RECEPTOR GABA_B

El receptor GABA_B es una proteína con 7 segmentos transmembranales y con un peso molecular de 80 kd. Presenta homologías estructurales con los receptores metabotrópicos de adenosina, somatostatina y glutamato (mgluR) (Kaupmann, et al., 1997). Es insensible a la bicuculina, a barbitúricos y a las benzodiazepinas, pero es activado por baclofen (β , p-clorofenil GABA).

Una de las principales funciones de este receptor es modular la liberación del neurotransmisor a través de una respuesta metabotrópica mediada por proteínas G tanto en la pre como en la postsinápsis (Thompson y Gähwiler, 1992; Pitler y Alger, 1994; Misgeld, et al., 1995).

En las terminales presinápticas la activación del receptor GABA_β inhibe canales de Ca²⁺, produciendo una reducción en la liberación del neurotransmisor (Scholz y Miller, 1991; Dittman y Regehr, 1996; Kaupmann, et al., 1997; Wu y Saggau, 1997).

Postsinápticamente incrementa la conductancia al K⁺ a través de la activación de proteínas G, generando el llamado IPSP lento (200 ms), que es bloqueado por antagonistas del receptor GABA_β y por bloqueadores de canales de K⁺ (Dutar y Nicoll, 1988ab; Soltesz, et al., 1988). La respuesta al baclofen persiste después de bloquear la transmisión sináptica y la entrada de Ca²⁺ con Cd²⁺, lo que indica una respuesta postsináptica no relacionada con corrientes de K⁺ activadas por Ca²⁺ (Newberry y Nicoll, 1985).

El baclofen fue el primer agonista selectivo para el receptor GABA_β que permitió la separación farmacológica de los receptores GABA_A y GABA_β (Tabla 1).

Recientemente se han descubierto análogos de baclofen y de GABA que tienen una acción agonista para este receptor entre ellos el ciclofen, el 3-aminopropil ácido fosfínico (APPA) (Froestl, et al., 1995), el 3-aminopropil (metil) ácido fosfínico (AMPPA) (Howson, et al., 1993) y el (3-Amino-2(S)-hidroxipropil) metil ácido fosfínico, los cuales tienen una alta afinidad por este receptor. Hay otros compuestos de baja afinidad como ginsenoside y el ácido γ-hidroxibutírico (GHB) (Williams, et al., 1995).

Los primeros antagonistas del receptor GABA_β sintetizados fueron el ácido δ-aminovalérico y el 3-aminopropano ácido sulfínico (3APS), los cuales no son ligandos selectivos (Giotti, et al., 1983). Posteriormente se descubren derivados del baclofen, como el faclofen que es un débil pero selectivo antagonista (Kerr, et al., 1987). Saclofen y 2-hidroxisaclofen, presentan mayor afinidad por este receptor (Kerr, et al., 1988). Ver figura 7. Antagonistas con mayor afinidad y capaces de cruzar la barrera hematoencefálica son: CGP 35348 (Olpe, et al., 1990), CGP 36742 (Olpe, et al., 1993), CGP 55845 y CGP 54626.

Tabla 1. Características de los receptores GABA_A y GABA_B

	GABA _A	GABA _B
Sistema efector	Canal de Cl ⁻	Canales de Ca ²⁺ (↓) y K ⁺ (↑)
Sistema acoplador	Ligando directo	Proteínas G Adenilato ciclasa Fosfatidilinositol
Agonistas	GABA, muscimol THIP, isoguvacina	GABA, baclofen, ciclofen APPA, AMPPA, ginsenoside
Antagonistas		Faclofen, 2-Hidroxisaclofen, Saclofen, CGP 35348, CGP 36742, CGP 46381, CGP 55845, CGP 54626, CGP 56999.
Competitivos	Bicuculina y GABAzina	
No competitivos	Picrotoxina, TBPS	
Moduladores		
Positivos	Benzodiazepinas, barbitúricos	?
Negativos	DBI, Esteres de β-Carbolina Ro 54863, esteroides y picrotoxina.	
Localización	Principalmente Postsináptica	Principalmente Presináptica

Los efectos diferenciales de antagonistas del receptor GABA_B, han permitido establecer la posible existencia de subtipos de receptores GABA_B con diferente localización, y propiedad farmacológica (Dutar y Nicoll 1988ab; Harrison, 1990; Deisz, et al., 1992; Potier y Dutar, 1993; Bonanno y Raitery, 1993).

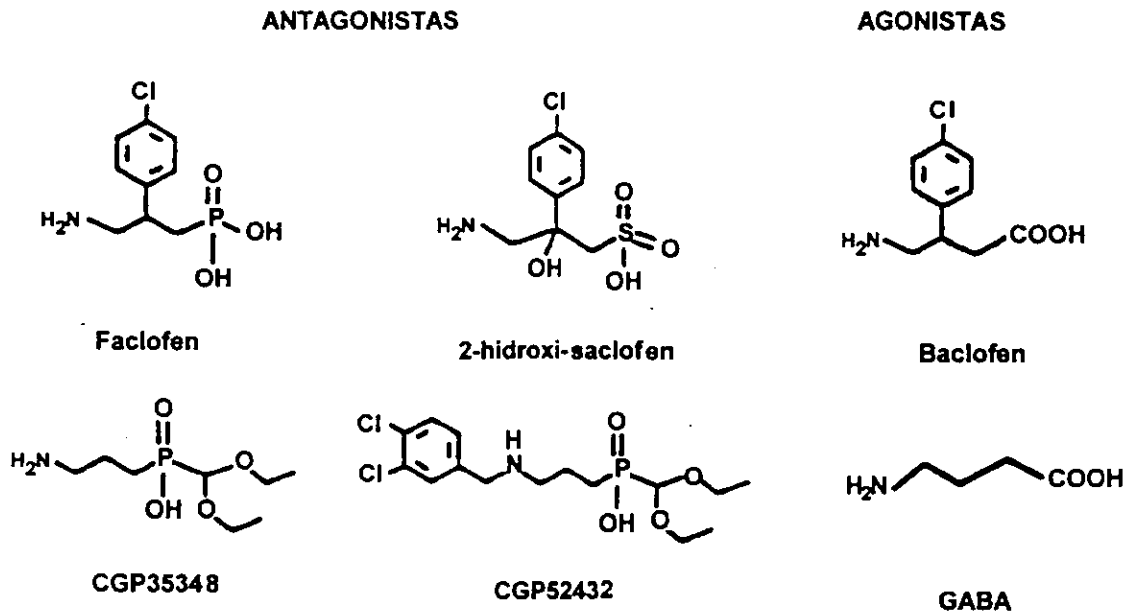


Figura 7. Estructura química de algunos antagonistas y agonistas del receptor GABA_B.
(Mott y Lewis, 1994).

ESTRUCTURA MOLECULAR

Kaupmann y cols. (1997) clonaron el receptor GABA_B, y lo expresaron en ovocitos de *Xenopus*. Primero se aisló una clona de 4.4 kb de ADNc que codifica una proteína de 960 aminoácidos designada como GABA_B R1a. Posteriormente se aisló una clona más pequeña de 2.9 kb de ADNc que codifica una proteína de 844 aminoácidos, designada como GABA_B R1b. Ambos son farmacológicamente iguales ya que muestran una afinidad similar por unir su ligando. El receptor GABA_B R1 es abundante en células piramidales del hipocampo, en células granulares del giro dentado y en los ganglios basales (Kaupmann, et al., 1997).

MODULACIÓN PRESINÁPTICA POR ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR GABA_B

El receptor GABA_B ha sido implicado en la modulación pre y postsináptica de corrientes de K⁺ de la familia de los GIRKs (Kir 3) en las neuronas del SNC (Sodickson y Bean, 1996), donde disminuyen la duración del potencial de acción en las sinapsis de los vertebrados (Gage, 1992). Sin embargo, otros estudios indican que hay pocas evidencias de inhibición presináptica mediante este mecanismo (Kim y Dudek, 1992; Chen G y Van den Pol, 1998; Miller, 1998; Takahashi, et al., 1998).

En las terminales sinápticas, la activación de los autorreceptores GABA_B controlan la liberación de GABA, y los heterorreceptores disminuyen la transmisión sináptica al reducir la liberación de glutamato, noradrenalina, dopamina, sustancia P y somatostatina (Kaupmann, et al., 1997).

Se ha reportado que las proteínas de la familia G_i y G_o son activadas por el receptor GABA_B, ya que el pretratamiento con toxina pertussis (PTX) bloquea el efecto inhibitorio del baclofen (Dolphin, 1995). Sin embargo, diversos estudios indican que los receptores GABA_B presinápticos presentan una sensibilidad variable a PTX (Colmers y Williams, 1988; Dutar y Nicoll, 1988ab; Scholz y Miller, 1991; Thompson y Gähwiler, 1992; Huston, et al., 1993; Potier y Dutar, 1993), lo que sugiere un acople diferencial del receptor GABA_B con las proteínas G (Perkinton y Shira, 1998).

Estudios previos establecen que el receptor GABA_B presináptico inhibe la entrada de Ca²⁺ dependiente de voltaje, por estar negativamente acoplado a la actividad de la adenilato ciclasa (Mott y Lewis, 1994), ya que la inhibición de las corrientes de Ca²⁺ por baclofen es antagonizada por forskolina (activador de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa) (Kamatchi y Ticku, 1990) y por análogos de AMPc (8-bromo AMPc y dibutilil AMPc) los cuales activan a la PKA (Travagli, et al., 1991).

En contraste, en sinaptosomas cerebrocorticales de rata se mostró que la inhibición presináptica del glutamato, por la activación del receptor $GABA_B$, es a través de la PKC (Sanchez-Prieto, et al., 1996; Perkinton y Sihra, 1998). La activación por esteres de forbol, PDB (10^{-6} M) y PMA (10^{-6} M) bloquean la respuesta pre y postsináptica del baclofen, mientras que los antagonistas de la PKC, staurosporina (10^{-8} M) y polimixina B (5×10^{-6} M), revierte la acción de PMA y potencian la acción del baclofen (Kamatchi y Ticku, 1990) (Figura 8).

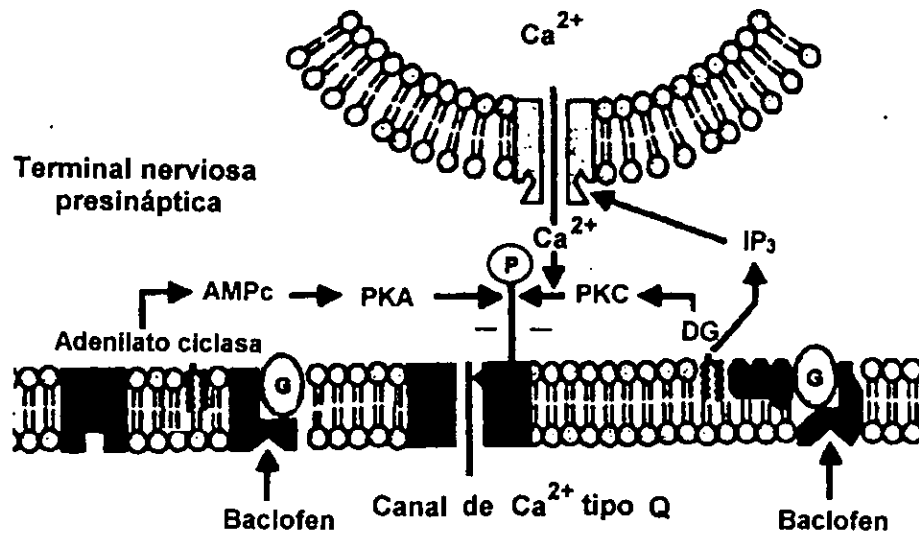


Figura 8. Modulación presináptica del canal de Ca^{2+} tipo Q por la activación del receptor $GABA_B$ (Modificado del Fossier, et al., 1999)

Se ha establecido que una fuerte despolarización (un prepulso de 120 mV) ocasiona un cambio conformacional que separa físicamente la proteína G del receptor $GABA_B$ (Dolphin, 1996).

Estudios neurológicos y electrofisiológicos en diversas regiones cerebrales indican que el efecto mediado por el receptor $GABA_B$ es dependiente de la frecuencia y de la intensidad de estimulación, lo que sugiere que los moduladores presinápticos se activan dependiendo de la actividad sináptica (Dutar y Nicoll, 1988ab; Kombian, et al., 1996). En neuronas de médula

espinal de *Xenopus*, el baclofen inhibe la corriente de Ca^{2+} a voltajes entre -10 y -40 mV, la cual va disminuyendo a voltajes más positivos (Wall y Dale, 1994).

RECEPTOR GABA_c

El receptor GABA_c es una proteína que no es activada por baclofen, barbitúricos, benzodiazepinas o esteroides (Bowery, 1993), es conocido como GABA_{NANB} (No-A, No-B) ó GABA_p (por ser clonado en la retina). Este receptor es similar al receptor GABA_A por ser activado por ligando y por presentar un canal de Cl⁻. Es activado con bajas concentraciones de GABA y presenta una localización restringida en el SNC. Los estudios más extensos se han realizado en la retina de vertebrados.

G. EL POTENCIAL DE CAMPO

Los potenciales de campo son registros extracelulares de corrientes iónicas asociadas a la actividad de un grupo de neuronas. Las corrientes producen espigas poblacionales por la sumación de potenciales de acción. La amplitud de estas espigas depende de la descarga sincrónica de las células, de la distribución de la población neuronal activa y de la resistencia del tejido.

El fluido extracelular constituye un volumen conductor alrededor de las neuronas, las cuales al estar en reposo tienen sus membranas uniformemente polarizadas y no producen flujo de corriente. Pero cuando se activan por un impulso nervioso, la polarización deja de ser uniforme y se producen flujos de corriente de una parte de la neurona a otra (se forma un dipolo) a través del fluido extracelular. Esto establece un campo eléctrico en el tejido.

El potencial de acción registrado extracelularmente es una onda trifásica (Ver figura 9: A-C) dada por el cambio en la localización de los pozos y las fuentes de corriente activa. Al punto en el que las corrientes fluyen hacia el interior de la célula se le denomina pozo (corrientes entrantes activas). Al punto por donde sale la corriente se le llama fuente

(corrientes salientes). Por convención, en un registro extracelular una onda hacia arriba es positiva (+) y representa una corriente saliente, mientras que una onda hacia abajo es negativa (-) y representa una corriente entrante.

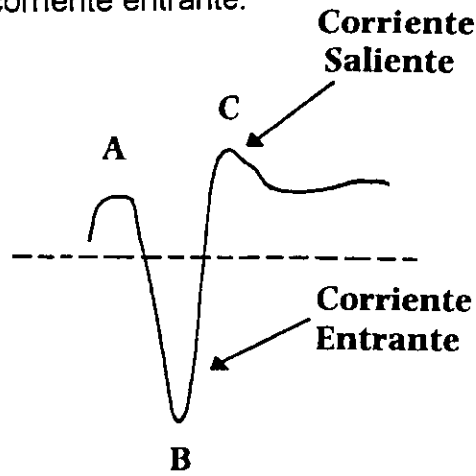


Figura 9. Potencial de acción registrado extracelularmente.

Si se registra en la parte media de un axón, las corrientes entrantes se desplazan hacia la membrana aleadaña originando corrientes salientes. Cuando el flujo de corriente se concibe de positivo a negativo, las cargas positivas salientes se dirigen nuevamente hacia el pozo para cerrar el circuito. Como estas corrientes cambian con el tiempo, es común obtener ondas trifásicas, que representan la propagación del potencial de acción (Johnston y Wu, 1995).

Cuando se registra cerca de somas neuronales se observa una espiga difásica que consiste en una espiga negativa seguida por una fase positiva. Esto se debe a que el potencial de acción incluye una rápida despolarización de la membrana por corrientes entrantes de Na^+ y una rápida repolarización por corrientes salientes de K^+ (Figura 10).

El componente negativo corresponde a la despolarización de la membrana en el soma por el flujo de corriente extracelular que proviene de la membrana de las dendritas. La fase positiva corresponde a la reversión en el flujo de corriente extracelular por la rápida repolarización de la membrana del soma (Rall W, 1992).

A la neurona se le puede considerar como un dipolo eléctrico debido a que durante el pico del potencial de acción en la membrana del soma se da lugar a una corriente activa (pozo), y en las dendritas se da una corriente pasiva (fuente) que cierra el circuito, por tanto las dendritas son positivas con respecto al soma. Las aferentes sinápticas dan lugar a cambios en estas corrientes. Las entradas sinápticas excitatorias en las dendritas apicales dan lugar a una corriente entrante (pozo), y en el soma a una corriente saliente pasiva (fuente). Al poder representar a las neuronas como dipolos se pueden medir las corrientes iónicas extracelulares de estos dipolos por el ángulo sólido cuyo vértice está en la punta del electrodo de registro y su valor depende del tamaño del dipolo y la distancia entre el punto de observación y el dipolo neuronal. El punto de observación puede ser positivo o negativo dependiendo de la posición con respecto al dipolo neuronal (Johnston y Wu, 1995).

En la figura 11 se muestran registros realizados en el bulbo olfatorio del conejo los cuales han permitido hacer una interpretación y reconstrucción teórica del potencial de campo. Los registros se realizaron en las siguientes capas: MBL que es la capa donde se encuentran los somas de las células mitrales y donde se originan las dendritas; el glomérulo (GL) que es la capa donde terminan las dendritas primarias y la tercera capa es la plexiforme (EPL) la cual se localiza entre las capas MBL y GL.

Se designaron tres períodos de tiempo (ms) para el análisis, los dos primeros duran alrededor de un ms. y el tercero de 3.5 - 8 ms. En el primer período se muestra un pico positivo en GL y uno negativo en MBL, es decir cuando se registra en el origen y terminación de las dendritas de las células mitrales, el curso temporal es similar pero de signo opuesto. En la capa intermedia EPL se presenta una secuencia trifásica (+ - +).

Durante el periodo II se observa un pico negativo en GL por la llegada despolarizante a la periferia dendrítica y uno positivo en MBL por la repolarización (Rall y Shepherd, 1968).

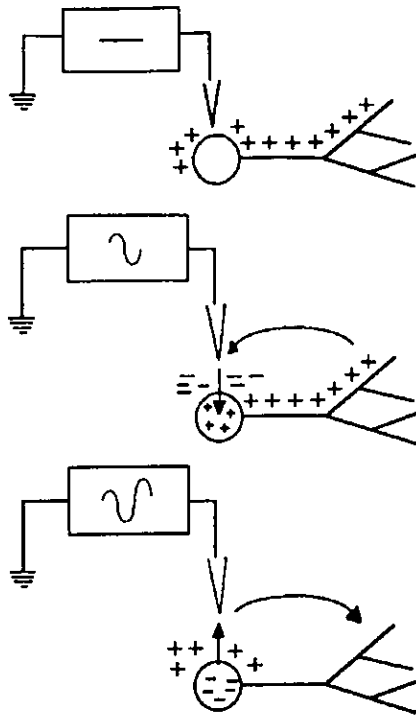


Figura 10. Registros durante el potencial de acción en el soma.

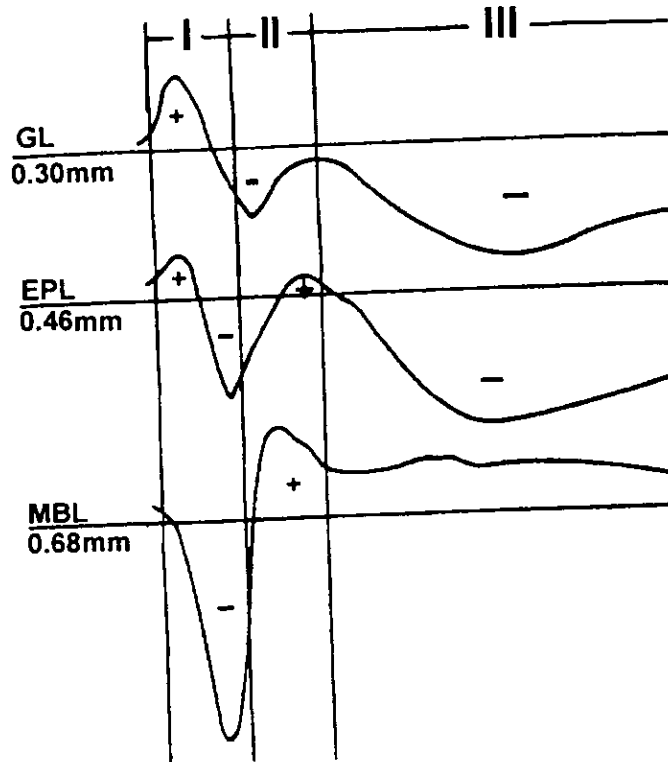


Figura 11. Registros de potenciales extracelulares en diferentes capas histológicas del bulbo olfatorio del conejo (Modificado de Rall y Shepherd, 1968)

COMPONENTES SINÁPTICOS POBLACIONALES EN EL NEOESTRIADO

El neoestriado no presenta una estructura laminar (Malenka y Kocsis, 1988) y el electrodo de registro no puede ser selectivamente colocado sobre el árbol dendrítico. Por esta razón se recurre a espigas poblacionales ortodrómicas (Barral, et al., 1999).

Aplicando la técnica de registro de potencial de campo en rebanadas neoestriatales se obtienen dos componentes en la espiga poblacional:

1) El potencial antidrómico, llamado N_1 , se origina al estimular eléctricamente el axón y el potencial de acción viaja hacia el soma. Es bloqueado con procaina y TTX.

2) El potencial ortodrómico, conocido como N_2 , se obtiene cuando se estimulan las aferentes que llegan al árbol dendrítico o soma de la neurona, generan un potencial sináptico que viaja hacia el axón, sitio donde se produce el potencial de acción. Este potencial N_2 es bloqueado con bajo Ca^{2+} (0.5 mM) y alto Mg^{2+} (6.0 mM) extracelular, con TTX, con Cd^{2+} y con antagonistas de aminoácidos excitadores como kinurenato (1mM) y CNQX (10 μ M) (Malenka y Kocsis, 1988; Miljanich y Ramachandran, 1995; Bargas, et al., 1998).

II HIPÓTESIS

La activación del receptor GABA_B en las aferentes neostriatales, disminuye la liberación del neurotransmisor glutamato. Esta liberación depende de varios tipos de canal de Ca²⁺. Si la inhibición presináptica producida por la activación del receptor GABA_B, involucra alguno de estos canales, entonces al aplicar su antagonista selectivo se ocluirá el efecto del baclofen en la transmisión.

III OBJETIVO

Diversos estudios en el SNC han mostrado que la activación presináptica del receptor GABA_B modula la transmisión sináptica, modificando la liberación del neurotransmisor mediada por la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Kamatchi y Ticku, 1990; Nisenbaum, et al., 1992; Mintz y Bean, 1993; Kombian, et al., 1996; Dittman y Regehr, 1996; Takhashi, et al., 1998; Chen G y Anthony, 1998; Perkinton y Shira, 1998). El objetivo del presente trabajo es determinar farmacológicamente cuales son los canales de Ca²⁺ implicados en la modulación por la activación del receptor GABA_B en las aferentes glutamatérgicas del neostriado.

II HIPÓTESIS

La activación del receptor GABA_B en las aferentes neostriatales, disminuye la liberación del neurotransmisor glutamato. Esta liberación depende de varios tipos de canal de Ca²⁺. Si la inhibición presináptica producida por la activación del receptor GABA_B, involucra alguno de estos canales, entonces al aplicar su antagonista selectivo se ocluirá el efecto del baclofen en la transmisión.

III OBJETIVO

Diversos estudios en el SNC han mostrado que la activación presináptica del receptor GABA_B modula la transmisión sináptica, modificando la liberación del neurotransmisor mediada por la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Kamatchi y Ticku, 1990; Nisenbaum, et al., 1992; Mintz y Bean, 1993; Kombian, et al., 1996; Dittman y Regehr, 1996; Takhashi, et al., 1998; Chen G y Anthony, 1998; Perkinson y Shira, 1998). El objetivo del presente trabajo es determinar farmacológicamente cuales son los canales de Ca²⁺ implicados en la modulación por la activación del receptor GABA_B en las aferentes glutamatérgicas del neostriado.

IV MÉTODO

A. OBTENCIÓN DE LAS REBANADAS

Los experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro de ratas macho de la cepa Wistar, de 100 a 120 g. Los animales fueron anestesiados con éter y decapitados para extraer el cerebro, el cual fue sumergido en una solución fisiológica fría (4°C), compuesta de (en mM): 125.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃ y 11.0 glucosa, oxigenada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ ajustada a una osmolaridad de 300 miliosmoles por litro y un pH de 7.40.

Se separaron los hemisferios y se trasladaron a un vibratomo donde se obtuvieron rebanadas sagitales de 400 µm de espesor que incluían la neocorteza, el cuerpo calloso y el neoestriado. Se mantuvieron en incubación en solución fisiológica a temperatura ambiente durante una hora, antes de trasladarlas a la cámara de registro. Dentro de ésta se les mantuvo oxigenadas y con un flujo constante de 1-2 ml/min de solución fisiológica a una temperatura de 32 °C.

B. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

Los registros extracelulares se obtuvieron estimulando (estimulador Grass S48) las fibras aferentes al neoestriado (intensidad: 4-30 V; duración: 0.01-0.04 ms; frecuencia: 0.2-0.4 Hz), con un electrodo bipolar concéntrico de tungsteno, con un diámetro de 50 µm.

Los pulsos se controlaron a través de una unidad aisladora de estímulos en donde se reguló la amplitud, duración y frecuencia de los mismos (Digitimer Ltd. modelo DS2A).

El registro de la actividad se realizó con electrodos fabricados a partir de capilares de vidrio de borosilicato de 1.0 mm de diámetro con una resistencia de 2 a 4 MΩ, llenos de una solución de NaCl al 0.9%.

Las sinápsis excitatorias corticoestriatales fueron estimuladas a un intervalo interestímulo de 20 ms y con una intensidad igual a la que provoca el 50% de la respuesta máxima.

Los potenciales de campo se amplificaron (Grass Modelo P15) y se desplegaron en el osciloscopio. También se digitalizaron y almacenaron en cintas de video VHS para su posterior análisis (Figura 12).

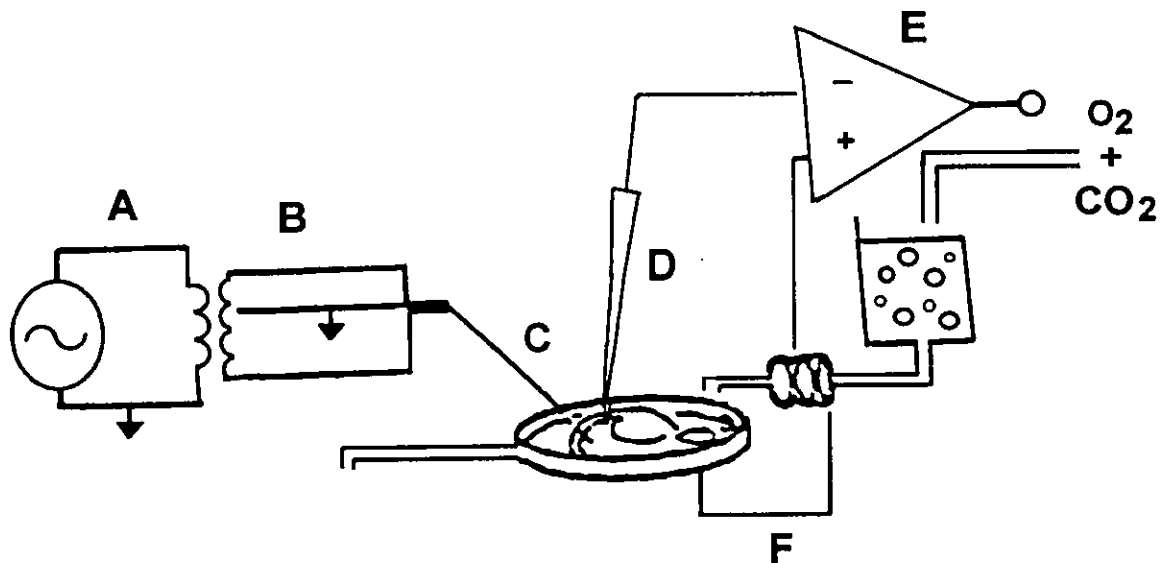


Figura 12. Se muestra el arreglo experimental para el registro de potenciales de campo. A) estimulador, B) unidad aisladora de estímulos, C) electrodo bipolar concéntrico de estimulación, D) electrodo de registro, E) amplificador, F) cámara de registro a 32 °C .

Los experimentos fueron realizados en presencia de bicuculina (10 μ M) bloqueador específico del receptor GABA_A, para eliminar el componente inhibitorio y trabajar únicamente con el componente glutamatérgico postsináptico.

Para determinar que tipos de canales de Ca²⁺ son modulados por la activación del receptor GABA_B se utilizaron toxinas específicas para los canales de Ca²⁺ tipo N, y P / Q

ω -CgTx-GVIA (para canales de Ca^{2+} tipo N), ω -AgTx-TK (para canales de Ca^{2+} tipo P o Q, dependiendo de la concentración) (Peptidos Int. Louisville KY).

C. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

FACILITACIÓN POR PULSOS PAREADOS (PAIRED PULSE FACILITATION)

La transmisión sináptica química presenta cambios a corto plazo (en el rango de ms. a min.) en su eficiencia sináptica, tales como la facilitación y la depresión (Magleby, 1987).

La facilitación sináptica provocada por un par de estímulos, refleja un incremento en el número de paquetes de neurotransmisor liberado por la terminal nerviosa presináptica durante el segundo estímulo (Katz y Miledi, 1968).

Una hipótesis para explicar la facilitación sináptica habla de la inactivación de corrientes de K^+ en la terminal presináptica (Aldrich, et al., 1979), lo que causa facilitación por el incremento en el influjo de Ca^{2+} en los sucesivos potenciales de acción (Andrew y Dudek, 1985). Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco estudiada y no siempre hay aumento en la duración de la espiga (Bittner y Baxter, 1983).

La facilitación por pulsos pareados (FPP) está mejor relacionada con la "hipótesis del Ca^{2+} residual" de Katz y Miledi (1968). Esta hipótesis propone que la facilitación sináptica provocada por un par de estímulos es consecuencia de la relación no lineal entre la entrada de Ca^{2+} y la respuesta sináptica. Una pequeña fracción del Ca^{2+} que entra en la terminal presináptica en respuesta al primer potencial de acción, permanece por varios milisegundos en el sitio de liberación debido a la lentitud del amortiguamiento del Ca^{2+} en relación al evento sináptico (Katz y Miledi, 1968; Rahamimoff, 1968). Si se presenta un segundo estímulo este Ca^{2+} residual se añade al Ca^{2+} que entra durante el segundo potencial de acción (Andreasen y Hablitz, 1995). Esto incrementa la probabilidad de fusión de las vesículas (Miledi y Thies,

1971; Parnas, et al., 1982), y por tanto la transmisión sináptica se facilita, aumentando la liberación del neurotransmisor (Charlton, et al., 1982; Zucker, 1989).

La liberación del neurotransmisor de las fibras presinápticas depende de la concentración de iones Ca^{2+} en el medio extracelular de una manera no lineal. Estos iones actúan de manera cooperativa para causar la liberación de un cuanto de neurotransmisor (Dodge y Rahamimoff, 1967; Hubbard, et al., 1968; Katz y Miledi, 1970; Dudel, 1981).

La mayor parte de los investigadores consideran el siguiente modelo:

$$\text{liberación} = k (\text{Ca}^{2+})^4$$

donde k es una constante y el $(\text{Ca}^{2+})^4$ representa los iones Ca^{2+} en el sitio de liberación, (Magleby, 1987).

Cuando las sinapsis son estimuladas en rápida sucesión (20 a 40 ms) la respuesta de la segunda espiga poblacional (S_2) es facilitada en relación a la primera (S_1) lo que indica que a intervalos cortos de estimulación se observa mejor el evento presináptico a través de la FPP (Dunwiddie y Hass, 1985).

La liberación del neurotransmisor se realiza en sitios cercanos a los canales de Ca^{2+} , antes de que el Ca^{2+} sea atrapado por organelos (Blaustein, et al., 1978), expulsado por bombas de Ca^{2+} (Parnas, et al., 1982) o se equilibre uniformemente sobre la superficie de la terminal presináptica (Simon y Llinás, 1985).

La elevación de los niveles de Ca^{2+} en la terminal presináptica, a concentraciones submicromolares persiste por varios segundos después de un tren de potenciales de acción. Sin embargo, la liberación del neurotransmisor dura < 1 ms. (Barrett y Stevens, 1972). Esta discrepancia cinética puede ser entendida si se asume que la concentración local de Ca^{2+} intracelular se incrementa durante una estimulación sucesiva, alcanzando niveles

micromolares, necesarios para la liberación del neurotransmisor (Zucker, 1989; Roberts, et al., 1990; Adler, et al., 1991).

La concentración interna de Ca^{2+} , requiere varios segundos para retornar a los niveles pre estímulo, lo que indica que la remoción de Ca^{2+} es mucho más lenta que su influjo (Charlton, et al., 1982).

Puesto que la relación entre la entrada de Ca^{2+} en la terminal y la respuesta sináptica no es lineal, la FPP se incrementa cuando la concentración de Ca^{2+} externa es menor (0.5 mM) a la fisiológica (1.8 mM) o cuando se reduce la probabilidad de liberación por incrementar la relación $[\text{Mg}^{2+}] / [\text{Ca}^{2+}]$ (Manabe, et al., 1993). La segunda espiga poblacional (S_2) se hace mucho mayor que la primera (S_1), ya que la probabilidad de que el segundo potencial de acción presináptico libere al transmisor es más grande debido al efecto del Ca^{2+} residual (Del Castillo y Katz 1954; Thies, 1965; Katz y Miledi 1968). Ver figura 13

De manera análoga a la disminución del Ca^{2+} externo, los neuromoduladores presinápticos, como el GABA, pueden incrementar la FPP por disminuir la entrada de Ca^{2+} en la terminal. La FPP permite determinar si el evento es presináptico, ya que si la reducción en la eficiencia sináptica se debiera a factores postsinápticos, la primera (S_1) y segunda (S_2) espiga poblacional no cambiarían y ambas respuestas se verían alteradas en la misma proporción.

En un medio con alto Ca^{2+} extracelular (4 mM) aumenta la liberación del neurotransmisor con la primera respuesta pero posteriormente ocasiona depresión por pulsos pareados (Debanne, et al., 1996), es decir, la amplitud de la segunda respuesta es menor que la primera. Esto es ocasionado porque existe un almacén limitado de neurotransmisor el cual puede ser agotado con el primer estímulo (Betz, 1970; Zucker, 1989).

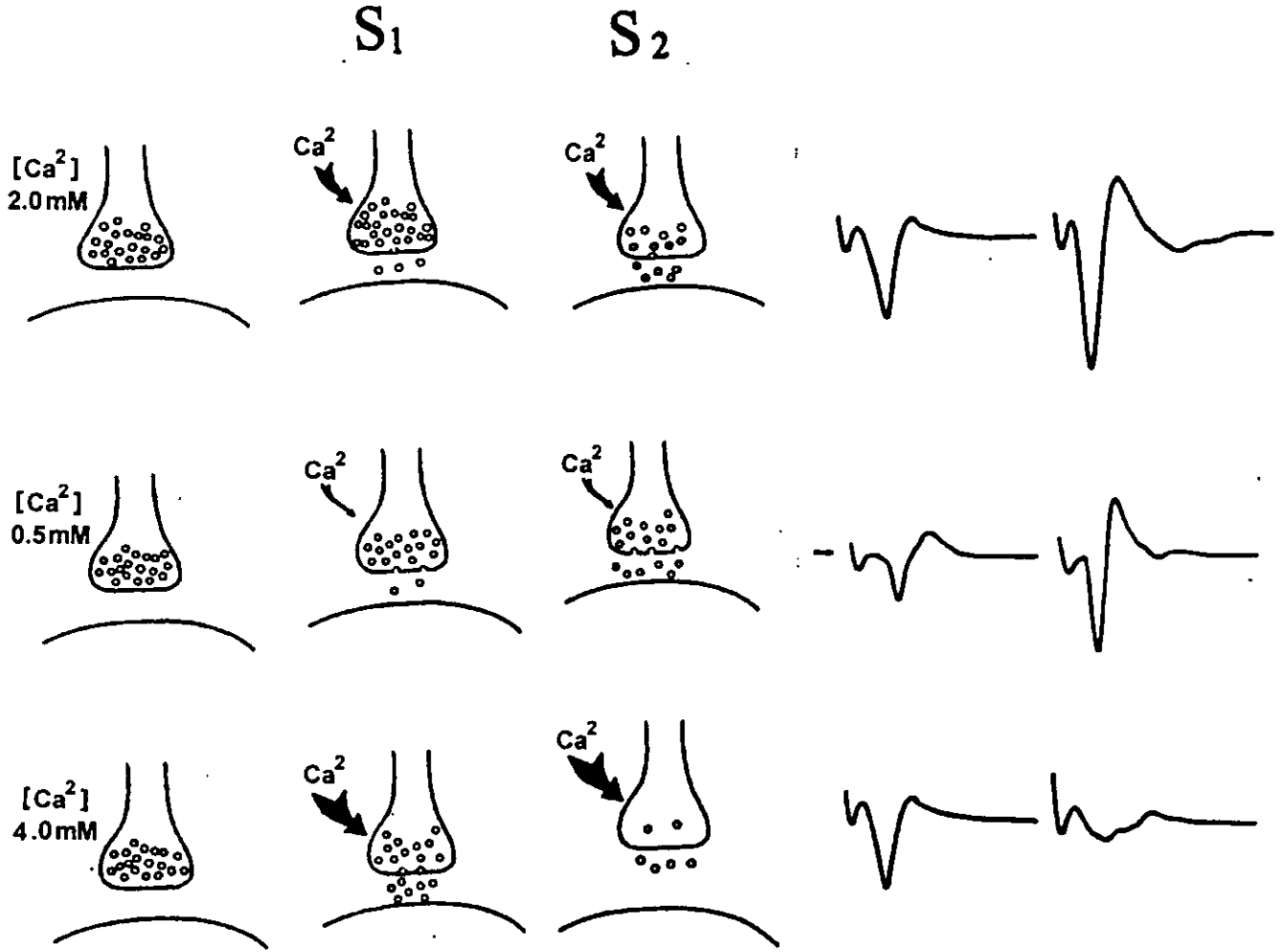


Figura 13. Se muestran los cambios en la relación S_1 / S_2 (FPP) con diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

D. ANÁLISIS DE DATOS

El % de incremento en la FPP de cada uno de los experimentos fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\% \text{ FPP} = 100 [S_2 / S_1 - 1] \quad (1)$$

Donde S_1 representa el % de FPP en condición control y S_2 el % de facilitación producida durante la aplicación de baclofen. De esta manera, se puede calcular cuánto aumenta la facilitación debido al baclofen. La facilitación control se ajustó para ver una relación $S_2/S_1 \approx 1$, y así determinar más fácilmente el efecto del baclofen y de los antagonistas de los canales de Ca^{2+} .

La curva dosis-respuesta fue analizada con la siguiente expresión:

$$\% \text{ FPP}_{(\text{BAC})} = \% \text{ FPP}_{(\text{MAX})} / [1 + \text{EC}_{50} / [\text{Bac}]^n] \quad (2)$$

Donde el $\% \text{ FPP}_{(\text{BAC})}$ es el porcentaje de incremento en la FPP producida por baclofen; $\% \text{ FPP}_{(\text{MAX})}$ es el efecto saturante; EC_{50} es el 50% del efecto máximo; $[\text{Bac}]$ es la concentración de baclofen y "n" es la pendiente de la función dosis-respuesta; una aproximación al coeficiente de Hill.

Para hacer el histograma de la gráfica 7 (el cual se muestra en resultados), a cada experimento se le aplicó la expresión 1.

Donde $S_1 = \% \text{ FPP}$ en condiciones control, es decir, después de incrementar la intensidad de estimulación para recuperar la facilitación inicial y S_2 es el efecto de baclofen en presencia de los antagonistas de canales de Ca^{2+} .

Para construir las gráficas de curso temporal de la acción de baclofen en presencia de los antagonistas de canales de Ca^{2+} , se promedió la relación S_2/S_1 (FPP) cada 5 min.

La significancia estadística fue analizada con una prueba estadística no paramétrica, (U de-Mann-Whitney utilizando el programa de SYSTAT) que se aplica a datos independientes y a variables ordinales o categóricas.

V RESULTADOS

Para determinar que canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son modulados por la activación del receptor GABA_B en las aferentes al neostriado, se realizaron registros extracelulares poblacionales utilizando el protocolo de FPP, el cual es utilizado como prueba de acción presináptica de un neuromodulador (Dunwiddie y Hass, 1985; Zucker 1989; Andreasen y Hablitz 1995; Debanne, et al., 1996; Hernández-Echeagaray, et al., 1998; Barral, et al., 1999).

A. BLOQUEO DEL EFECTO DEL BACLOFEN POR SACLOFEN, ANTAGONISTA SELECTIVO DEL RECEPTOR GABA_B .

Para probar que el efecto de baclofen en las aferentes glutamatérgicas al neostriado, se debe específicamente a la activación del receptor GABA_B , se utilizó un antagonista selectivo para este receptor, el saclofen a una concentración de $500 \mu\text{M}$ (Dutar y Nicoll 1988ab).

En la gráfica 1A se muestra el curso temporal de un experimento, donde se observa que el saclofen ($500 \mu\text{M}$) no genera un cambio en la facilitación con respecto al valor control. El baclofen ($2 \mu\text{M}$) en presencia de saclofen ($500 \mu\text{M}$), incrementa ligeramente la facilitación. Sin embargo, al quitar del medio al antagonista, y dejar sólo el baclofen ($2 \mu\text{M}$), la facilitación aumenta significativamente, lo que indica que el saclofen ($500 \mu\text{M}$) ocluye el efecto del baclofen ($2 \mu\text{M}$).

En la gráfica 1B se muestran las amplitudes (μV) de los potenciales poblacionales S_1 y S_2 , los cuales en condiciones control se ajustaron para tener una facilitación ≈ 1 . También se muestran los registros poblacionales representativos de cada fase experimental, los cuales están enumerados de acuerdo a las gráficas de curso temporal. Se señala el componente

antidrómico (N_1) y el ortodrómico (N_2) de una espiga poblacional. El efecto de baclofen (2 μ M) es solamente sobre el componente ortodrómico ya que el componente antidrómico no presenta cambios significativos, lo cual confirma que el efecto es presináptico.

B. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA ACCIÓN PRESINÁPTICA DEL BACLOFEN, AGONISTA DEL RECEPTOR GABA_B

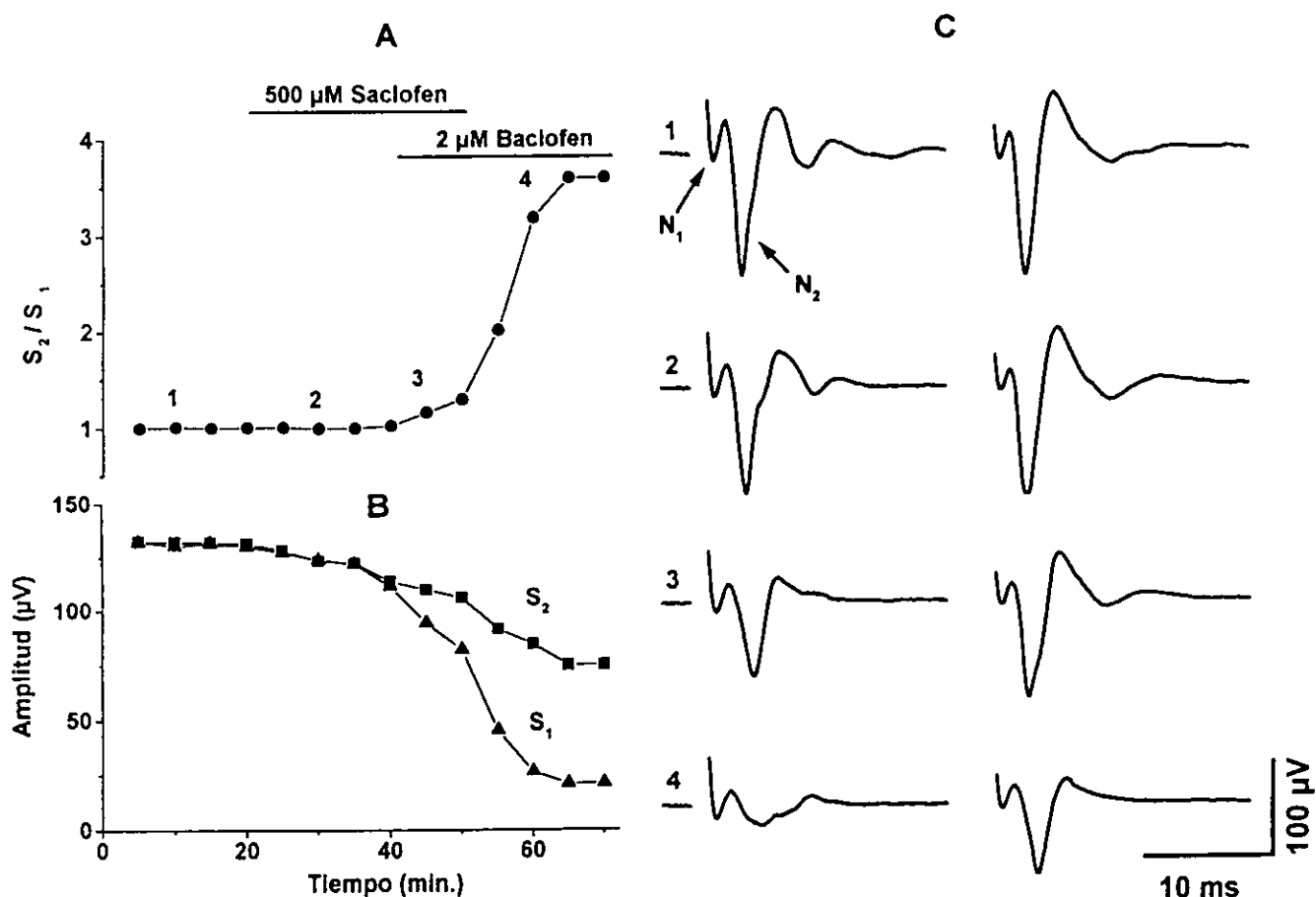
El efecto de la activación del receptor GABA_B en las aferentes al neostriado fue evaluado por el incremento en la FPP producido por baclofen, agonista específico de este receptor.

La gráfica 2 fue construida con 39 experimentos en diferentes rebanadas. Se muestra que el baclofen aumenta la relación S_2/S_1 (FPP) de manera dependiente de la concentración, produciendo un efecto similar al de reducir el Ca^{2+} extracelular (Katz y Miledi, 1968; Creager, et al., 1980; Debanne, et al., 1996).

Los números representan los experimentos realizados para cada concentración de baclofen, los puntos la media de la respuesta obtenida y las líneas verticales el error estándar.

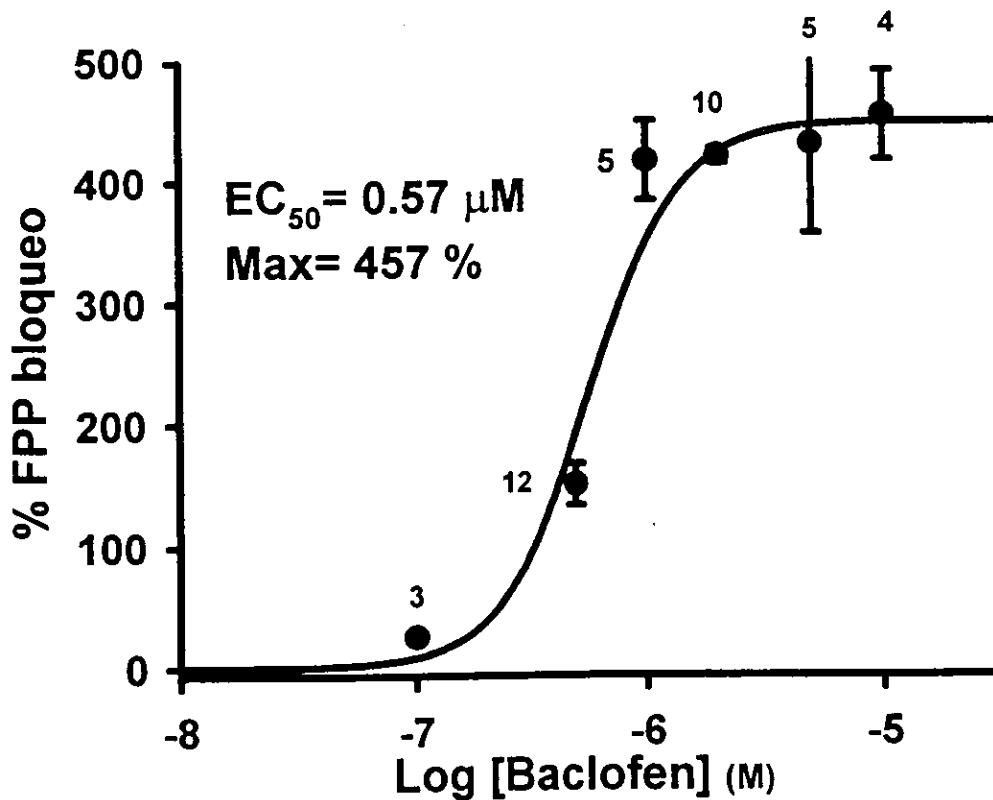
La concentración eficaz para producir el 50% del efecto total es de 0.57 μ M de baclofen, mientras que la máxima facilitación es de 457% respecto del control; obtenida a partir de concentraciones de 1 μ M de baclofen. La pendiente o coeficiente de Hill obtenido es superior a uno, lo que indica cooperatividad y/o amplificación por vías intracelulares de señalización.

El efecto de baclofen sobre el potencial poblacional es reversible.



Gráfica 1. Bloqueo del efecto del baclofen, por un antagonista específico del receptor GABA_B , el saclofen, a una concentración de 500 μM .

Se muestra que el efecto inhibitorio de baclofen (2 μM) es atenuado en presencia de saclofen (500 μM) pues la facilitación sólo tiene un pequeño incremento, lo que indica que la inhibición presináptica por baclofen es a través de la activación del receptor GABA_B . Note que al lavar el antagonista, la FPP se incrementa de manera significativa. Los registros de la derecha están enumerados de acuerdo a las gráficas de curso temporal.



Gráfica 2. Curva dosis-respuesta de la acción presináptica del baclofen, agonista del receptor GABA_B

Se muestra que el baclofen incrementa la FPP de manera dependiente de la concentración. Los números de cada punto representan el número de experimentos con cada concentración de baclofen, los puntos representan la media y las líneas verticales el error estándar. El valor de la EC₅₀ es de 0.57 μM de baclofen, y la facilitación máxima de 457%.

C. EL BACLOFEN NO ACTÚA SOBRE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO N y P EN LA AFERENTES GLUTAMATÉRGICAS AL NEOESTRIADO.

Previos estudios en las aferentes corticoestriatales reportan la participación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N en la liberación del neurotransmisor (Lovinger, et al., 1994; Bargas, et al., 1998). Para determinar cuál de ellos es modulado por el GABA a través de la activación del receptor GABA_B , se probó el efecto del baclofen en presencia de antagonistas selectivos para estos canales.

Para determinar si los canales de Ca^{2+} tipo N, localizados en estas aferentes son modulados a través de la activación del receptor GABA_B , se utilizó un antagonista específico para estos canales, la ω -CgTx-GVIA, a una concentración saturante de 1 μM (Feldman, et al., 1987; Boland, et al., 1994).

En la gráfica 3A se muestra que en presencia de esta toxina aumenta la relación S_2/S_1 , lo que produce un incremento en la FPP, lo cual indica la participación de estos canales en la liberación del neurotransmisor (Bargas, et al., 1998; Barral, et al., 1999).

Posteriormente, se incrementó la intensidad de estimulación para obtener una disminución en la relación S_2/S_1 y aumentar la participación de canales de Ca^{2+} no bloqueados, y así determinar mejor la acción del baclofen. En esta condición, el baclofen (2 μM), en presencia de ω -CgTx-GVIA (1 μM), persistió en aumentar la facilitación, lo que sugiere que el efecto del baclofen no está mediado por los canales de Ca^{2+} tipo N ya que la toxina no ocluyó su efecto.

En la gráfica 3B se muestran las amplitudes (μV) de los potenciales poblacionales S_1 y S_2 en las diferentes fases experimentales y en la parte derecha los registros representativos de los potenciales poblacionales, enumerados de acuerdo a las gráficas de curso temporal.

Se observa que el incremento en la FPP es acompañado por una disminución en la

amplitud del componente N_2 de la espiga poblacional S_1 , mientras que el componente N_1 no presenta cambios significativos, lo que muestra que el incremento en la FPP es por la acción presináptica del baclofen

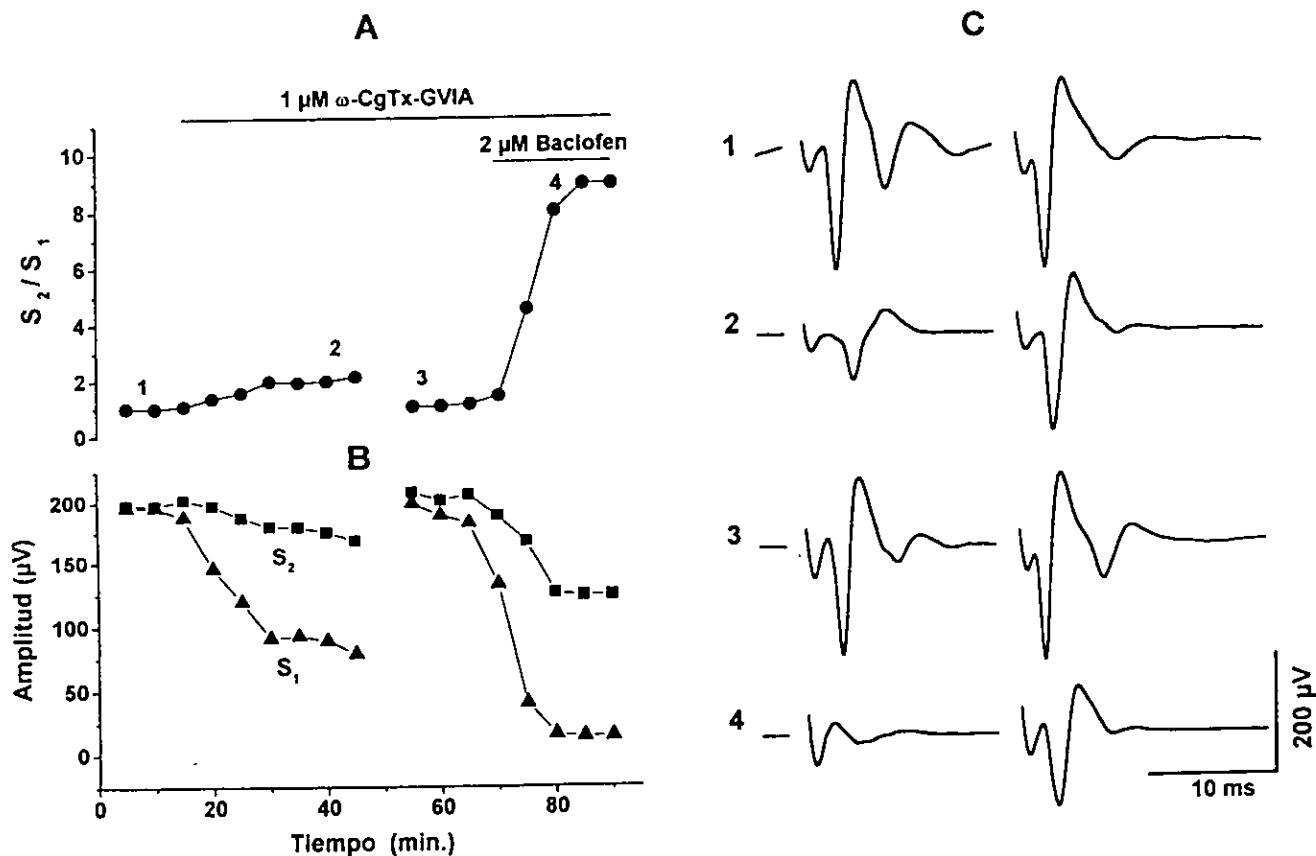
Para determinar si la activación del receptor $GABA_B$ en las aferentes al neocóstriado inhibe la liberación del neurotransmisor glutamato a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} tipo P, se utilizó un antagonista específico para estos canales, la ω -AgTx-TK a una concentración de 20 nM.

En la gráfica 4A se muestra que la ω -AgTx-TK (20 nM) bloquea canales que participan en la liberación del neurotransmisor ya que se incrementa la FPP. Al aumentar la intensidad de estimulación se recupera la facilitación con respecto al valor control. Al agregar baclofen (2 μ M) en presencia de esta toxina la FPP se incrementa significativamente, lo que sugiere que el receptor $GABA_B$ no modula canales de Ca^{2+} tipo P.

En la gráfica 4B se muestran las amplitudes (μ V) de los potenciales poblacionales S_1 y S_2 y en la parte derecha los registros poblacionales representativos de cada fase experimental.

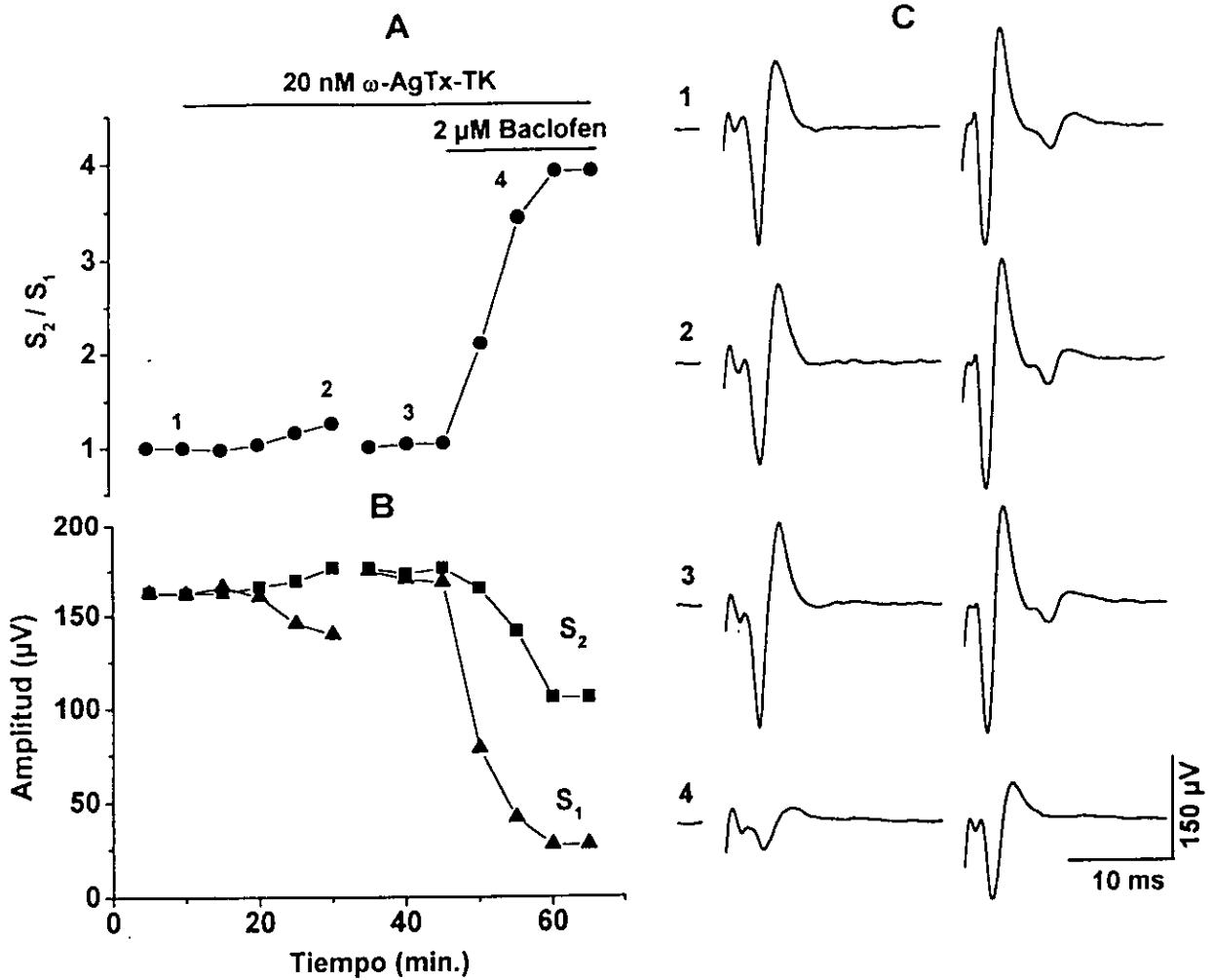
En la gráfica 5A se observa que la ω -AgTx-TK a una concentración de 50 nM incrementa la facilitación sináptica, lo que sugiere su participación en la liberación del neurotransmisor. Al incrementar el voltaje se recupera parcialmente la FPP con respecto al valor control. Cuando se agrega baclofen (2 μ M) en presencia del antagonista la facilitación sináptica se bloquea parcialmente.

En la gráfica 5B se muestran las amplitudes (μ V) de los potenciales poblacionales S_1 y S_2 , y a la derecha los registros representativos en cada fase experimental.



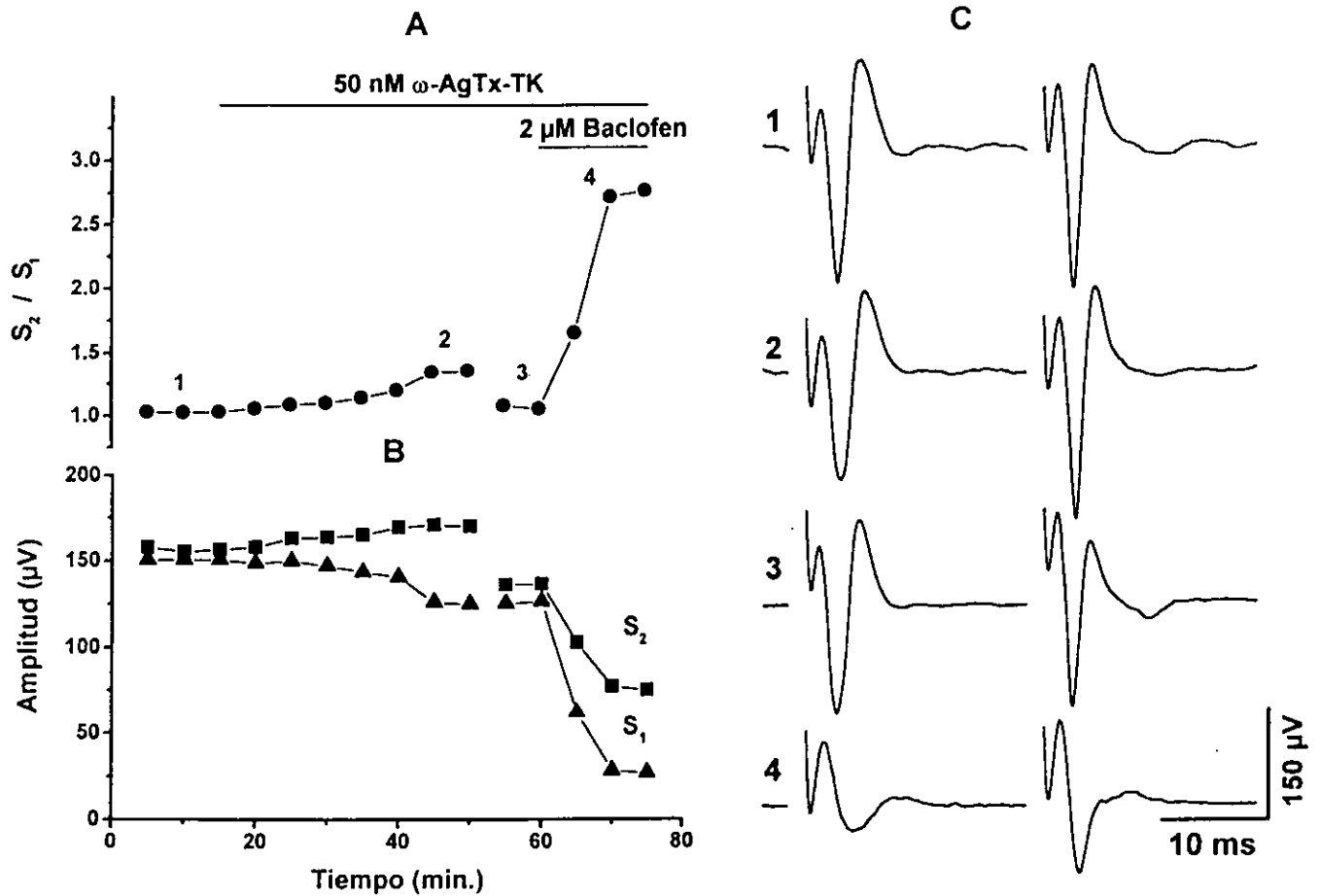
Gráfica 3. Los canales de Ca^{2+} tipo N no ocluyen el efecto presináptico del baclofen en las aferentes al neostriado.

Se muestra que los canales de Ca^{2+} tipo N participan en la liberación del neurotransmisor ya que en presencia $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ ($1 \mu\text{M}$) la facilitación se incrementa significativamente. Asimismo, se observa que la modulación por el receptor GABA_B no utiliza a los canales tipo N, ya que al agregar baclofen ($2 \mu\text{M}$) en presencia de $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ ($1 \mu\text{M}$) no se antagoniza el efecto del baclofen, y la facilitación vuelve a incrementarse. Los registros de la derecha están enumerados de acuerdo a las gráficas de curso temporal.



Gráfica 4. Los canales de Ca^{2+} tipo P, no ocuyen el efecto presináptico del baclofen en las aferentes corticoestriatales.

Los canales de Ca^{2+} tipo P participan en la liberación del neurotransmisor ya que la FPP aumenta en presencia de ω -AgTx-TK (20 nM). Al agregar baclofen (2 μ M) en presencia de ω -AgTx-TK (20 nM), la FPP se incrementa significativamente. Esto muestra que los canales de Ca^{2+} tipo P no ocuyen el aumento en la facilitación provocado por baclofen, por tanto no son los canales de Ca^{2+} modulados por la activación del receptor $GABA_B$.



Gráfica 5. A a una concentración de 50 nM de ω -AgTx-TK ya se ocluye parcialmente el efecto de baclofen.

Se muestra que la FPP aumenta en presencia de ω -AgTx-TK (50 nM), lo que indica su participación en la liberación del neurotransmisor. Al agregar baclofen (2 μ M) en presencia de esta toxina la facilitación vuelve a incrementarse pero no tanto como ocurre con 20 nM de ω -AgTx-TK (ver figura 7), lo que sugiere una oclusión parcial del efecto modulador del baclofen

D. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO Q EN LA MODULACIÓN DEL RECEPTOR $GABA_B$ EN LAS AFERENTES GLUTAMATÉRGICAS AL NEOESTRIADO

Se ha reportado una concentración saturante para inhibir los canales de Ca^{2+} tipo Q de 400 nM a 1 μ M de ω -AgTx-TK. En cultivos de neuronas corticales de rata, se ha reportado la existencia de 2 tipos de canales de Ca^{2+} tipo Q, uno bloqueado por la ω -AgTx-TK (1 μ M) de manera reversible en un 33% y otro bloqueado de manera irreversible (Teramoto, et al., 1997).

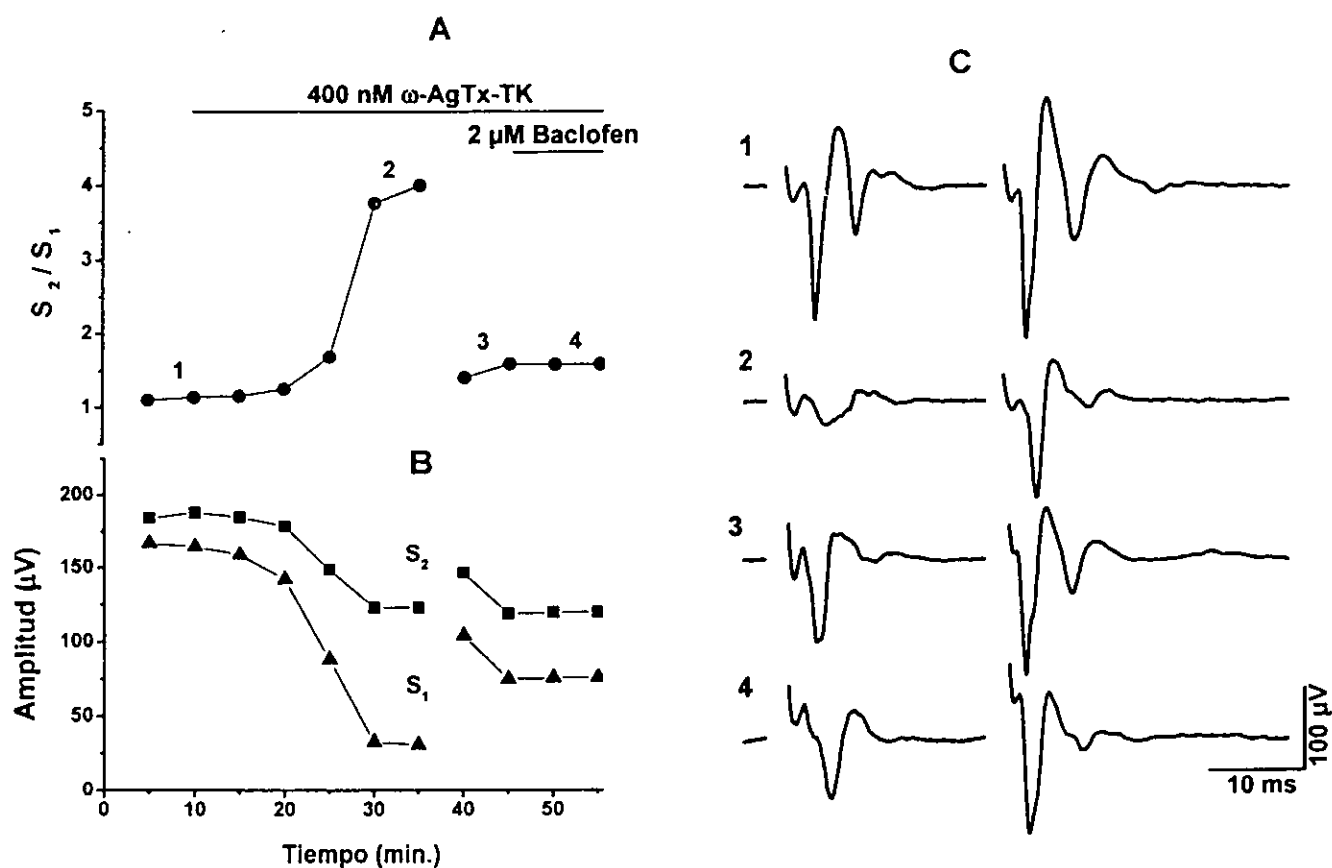
En la gráfica 6A se muestra que la aplicación de esta toxina a una concentración de 400 nM incrementa significativamente la facilitación, lo que muestra su participación en la liberación del neurotransmisor (Bargas, et al., 1998; Barral, et al., 1999). Al aumentar el voltaje se recupera parcialmente la facilitación. Cuando se agrega baclofen (2 μ M) en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM) se observa que la mayor parte de la facilitación sináptica ha sido bloqueada. Esto indica que el efecto del baclofen es mediado por canales de Ca^{2+} tipo Q.

En la gráfica 6B se muestran las amplitudes (μ V) de los potenciales poblacionales S_1 y S_2 en cada fase experimental y los registros poblacionales enumerados de acuerdo a las gráficas de curso temporal.

E. RESUMEN DEL BLOQUEO DEL EFECTO INHIBITORIO DE BACLOFEN POR ANTAGONISTAS DE CANALES DE Ca^{2+} .

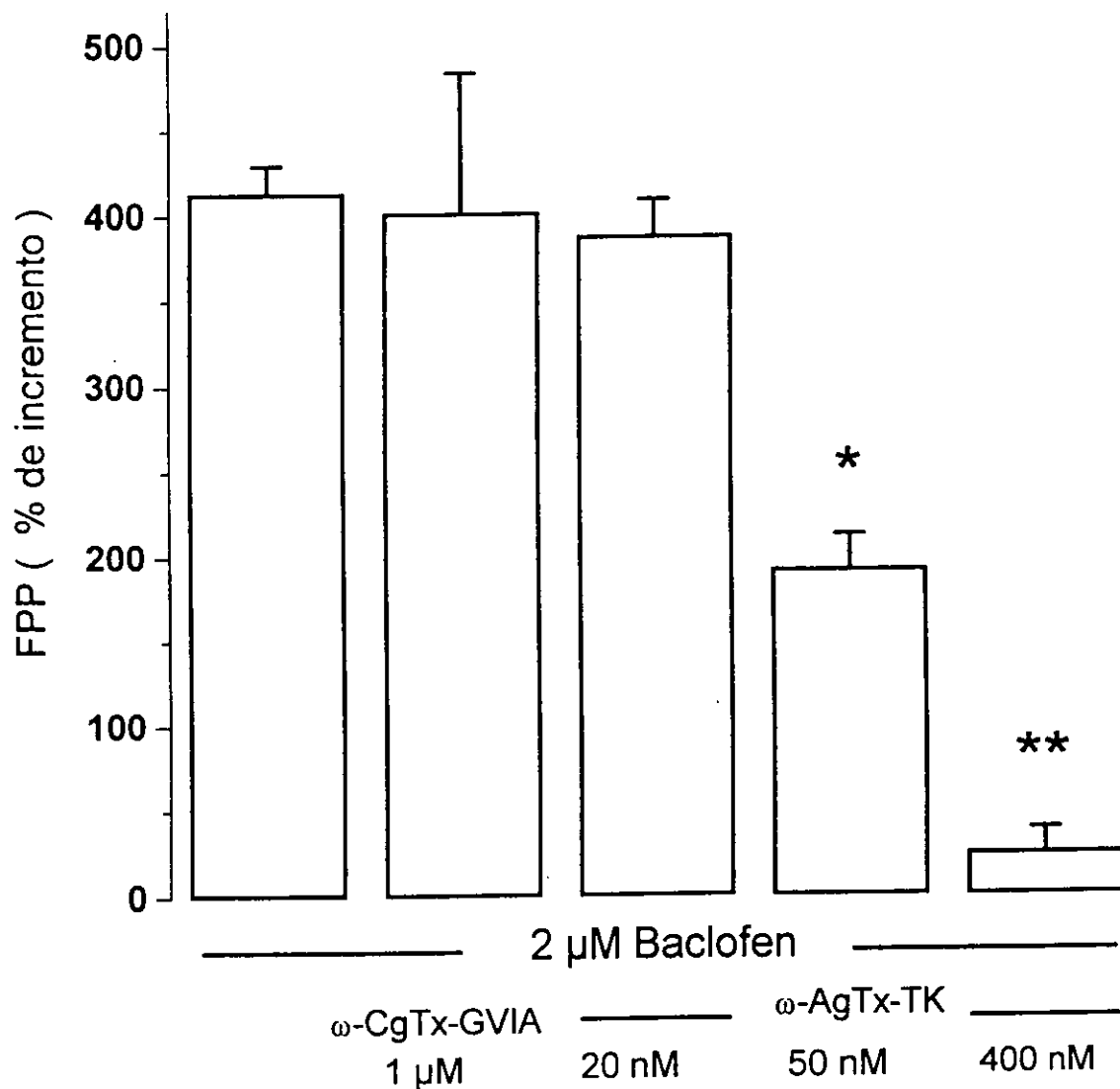
La gráfica 7 muestra un histograma que resume los efectos del baclofen (2 μ M) en ausencia y presencia de antagonistas de los canales de Ca^{2+} .

El bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo N y P, por ω -CgTx-GVIA (1 μM) y ω -AgTx-TK (20 nM), respectivamente, no ocluyen el efecto del baclofen ya que el incremento en la FPP producido por baclofen no presenta diferencias significativas a las obtenidas en ausencia de estas toxinas ($P > 0.327$ prueba U-de Mann-Whitney). Sin embargo, con ω -AgTx-TK (50 nM) ya se ocluye parcialmente el incremento en la FPP producido por baclofen ($P < 0.002$), ya que posiblemente se bloquea una porción de los canales de Ca^{2+} tipo Q. Al bloquear los canales de Ca^{2+} tipo Q con ω -AgTx-TK (400 nM) se bloquea casi totalmente el incremento en la FPP producida por baclofen ($P < 0.005$) (Ver tabla 2).



Gráfica 6. La modulación de las aferentes glutamatérgicas al neostriado por baclofen involucra canales de Ca^{2+} tipo Q.

Los canales de Ca^{2+} tipo Q participan de manera importante en la liberación del neurotransmisor, ya que al aplicar ω -AgTx-TK (400 nM) la facilitación se incrementa significativamente. Al agregar baclofen (2 μ M) en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM) la facilitación sináptica ya no se incrementa de manera significativa, lo que indica que esta toxina está ocluyendo el efecto del baclofen ya que la FPP producida por la activación del receptor $GABA_B$ está ocluida por un bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo Q.



Gráfica 7. Resumen de la acción de baclofen en ausencia y presencia de antagonistas de canales de Ca²⁺.

El histograma muestra que la ω-CgTx-GVIA (1 μM) y la ω-AgTx-TK (20 nM), no ocluyen el incremento en la FPP producida por baclofen (2 μM) ($P > 0.327$). Baclofen (2 μM) en presencia de ω-AgTx-TK (50 nM), ocluye parcialmente la FPP ($P < 0.002$), ya que se bloquean los canales de Ca²⁺ tipo P y parte de los Q. Al bloquear los canales de Ca²⁺ tipo Q con ω-AgTx-TK (400 nM) se ocluye casi completamente el incremento en la FPP inducido por baclofen (2 μM) ($P < 0.005$).

Tabla 2.

	Media	Error Estándar	n
Baclofen (2 μ M)	413.2	16.25	10
ω - Conotoxina - GVIA (1 μ M)	401.6	82.21	5
ω - Agatoxina - TK (20 nM)	388.1	20.93	2
ω - Agatoxina - TK (50 nM)	191.7	20.93	6
ω - Agatoxina - TK (400 nM)	24.7	13.86	4

VI DISCUSIÓN

Utilizando el protocolo de FPP en registros de campo se determinó que el baclofen, agonista del receptor $GABA_B$, incrementa la facilitación sináptica en las aferentes glutamatérgicas al neostriado de manera dependiente a la concentración. Obteniéndose una EC_{50} de $0.57 \mu M$ de baclofen y un efecto máximo de 457%. Los antagonistas selectivos de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N incrementan la FPP, lo que indica su participación en la liberación del neurotransmisor. Los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tipo N y P, ω -CgTx-GVIA ($1 \mu M$) y la ω -AgTx-TK ($20 nM$) respectivamente, no ocluyen el incremento en la FPP producido por baclofen, lo que indica que no son modulados por la activación del receptor $GABA_B$ en las aferentes al neostriado. La ω -AgTx-TK ($50 nM$) ocluye parcialmente el efecto del baclofen.

Al aplicar el antagonista de los canales de Ca^{2+} tipo Q, ω -AgTx-TK ($400 nM$), se ocluye casi totalmente el incremento de la FPP producida por el baclofen. Lo que sugiere que la activación del receptor $GABA_B$ en las aferentes neostriatales inhibe la liberación del neurotransmisor glutamato a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} tipo Q.

El receptor $GABA_B$ y los canales de Ca^{2+} .

Las neuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas en prácticamente todas las regiones del SNC de mamíferos y participan en una variedad de procesos fisiológicos.

El neurotransmisor de las neuronas neostriatales es el GABA, el cual actúa a través de los receptores $GABA_A$ y $GABA_B$, ambos presentes en el neostriado (Kaupmann, et al., 1997). Sin embargo, el receptor $GABA_B$ se encuentra en mayor proporción en las terminales presinápticas provenientes de la corteza (Nisenbaum, et al., 1992; Chan, et al., 1998).

Se ha reportado que el CNQX ($5-10 \mu M$), antagonista del receptor de glutamato AMPA, bloquea la respuesta ortodrómica poblacional, lo que indica la naturaleza glutamatérgica de

las entradas corticoestriatales (Bargas, et al., 1998). En contraste, el APV (30-50 μM), antagonista del receptor NMDA, disminuye parcialmente la amplitud del EPSP (Calabresi, et al., 1993; Bargas, et al., 1998).

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que están presentes en la terminal presináptica producen la liberación del neurotransmisor que depende de Ca^{2+} . Estos canales pueden ser diferencialmente modulados por diversos transmisores, los cuales producen cambios en la corriente de Ca^{2+} presináptica, alterando la eficiencia de la transmisión sináptica y la frecuencia de disparo (Grillner, et al., 1995).

Estudios electrofisiológicos han mostrado que el GABA modula presinápticamente la liberación de glutamato en las aferentes al neostriado disminuyendo el influjo de Ca^{2+} a través de la activación de heterorreceptores GABA_B (Scanziani, et al., 1992; Dittman y Regehr, 1996).

Protocolo de Facilitación por Pulsos Pareados (FPP).

El neostriado no presenta una estructura laminar y la estimulación ortodrómica con el registro de campo no puede aislar la respuesta *sináptica* poblacional del *potencial de acción* poblacional, por lo cual el efecto presináptico puede estar contaminado con el postsináptico (Barral, et al., 1999). Sin embargo, el paradigma de la FPP puede separar el efecto pre del postsináptico (Dunwiddie y Hass, 1985; Andreasen y Hablitz, 1995) y los argumentos que lo sustentan son los siguientes:

a) La aplicación de baclofen y de bloqueadores específicos para los diferentes canales de Ca^{2+} reducen la amplitud del componente ortodrómico pero no el antidrómico. Los efectos postsinápticos deberían de producir cambios en ambos componentes. b) Los antagonistas de los canales de Ca^{2+} tipo L no afectan las propiedades presinápticas y no cambian la FPP

(Lovinger, et al., 1994; Bargas, et al., 1998). c) El baclofen y los antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo N, P/Q disminuyen la 1ra y 2da respuesta ortodrómica simultáneamente, pero no en la misma proporción, incrementando de esta forma la FPP. Si el efecto fuera postsináptico, el cambio sería en la misma proporción en ambas respuestas (Barral, et al., 1999). d) Los cambios en la FPP obtenidos con el registro poblacional son similares a los observados con registros intracelulares (Hernández-Echeagaray, et al., 1998). e) No hay cambios en la resistencia de entrada postsináptica durante la aplicación de las toxinas (Bargas, et al., 1998).

Bloqueo del efecto del baclofen por saclofen, antagonista selectivo del receptor GABA_B.

El baclofen (2 μ M) disminuye la amplitud del componente ortodrómico de la espiga poblacional S_1 , incrementando de esta manera la FPP. Sin embargo, en presencia de saclofen (500 μ M), se atenúa este efecto, ya que la FPP no presenta cambios significativos. Esto demuestra que la inhibición presináptica producida por baclofen es por la activación específica del receptor GABA_B. A este respecto, reportes previos en el neostriado muestran resultados similares a los obtenidos en este estudio (Nisenbaum, et al., 1992; 1993)

Curva dosis-respuesta de la acción presináptica del baclofen, agonista del receptor GABA_B.

El baclofen incrementa la FPP de manera dependiente de la concentración al estimular las aferentes corticoestriatales, lo que sugiere que la activación del receptor GABA_B disminuye las corrientes de Ca^{2+} presinápticas produciendo una inhibición en la transmisión sináptica.

Estudios en las aferentes neostriatales de la rata han reportado que la inhibición de la transmisión presináptica por baclofen es dependiente de la concentración (Nisenbaum, et

al., 1992; Calabresi, et al., 1992; 1993). Pero hasta este estudio no se había reportado la relación dosis-respuesta en estas aferentes.

En el hipocampo, la disminución del EPSP mediado por la activación del receptor GABA_B es acompañado por una reducción de la corriente de Ca²⁺ presináptico (Wu y Saggau, 1995). Asimismo, en la terminal presináptica gigante de cáliz de Held, localizada en el núcleo medial trapezoide (MNTB), el baclofen causa inhibición en las corrientes de Ca²⁺ presinápticas y por tanto disminuye la transmisión sináptica (Isaacson, 1998).

La acción presináptica del baclofen en las aferentes corticoestriatales ocurre a concentraciones μM (Calabresi, et al., 1991; Nisenbaum, et al., 1992; Calabresi, et al., 1993).

Este estudio muestra que la concentración eficaz para producir el 50 % del efecto total es de 0.57 μM de baclofen. Estudios en la terminal presináptica de cáliz de Held han reportado una EC₅₀ de baclofen de 0.8 μM (Takahashi, et al., 1998), y en la transmisión sináptica excitatoria del núcleo supraóptico de rata se obtuvo una EC₅₀ de 0.27 μM (Kombian, et al., 1996).

Este estudio también encuentra que la máxima facilitación es de 457% respecto del control, obtenida a concentraciones de 1 μM de baclofen. La concentración saturante en el efecto del baclofen se obtuvo a concentraciones de 5-10 μM . Sin embargo, en terminales cerebrocorticales de rata la concentración saturante de baclofen es de 50 μM (Perkinton y Sihra, 1998). Esta diferencia puede ser debida a los diferentes paradigmas experimentales.

El coeficiente de Hill obtenido fue superior a uno, lo que indica cooperatividad y/o amplificación. Lo que sugiere que el receptor GABA_B puede usar diferentes señales intracelulares y blancos moleculares .

Efecto del baclofen en presencia de antagonistas específicos de los canales de

Ca^{2+} .

Se ha mostrado que los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N actúan cooperativamente para liberar el glutamato de las aferentes neostriatales (Lovinger, et al., 1994; Bargas, et al., 1998) y que estos pueden ser modulados por transmisores a través de cascadas intracelulares (Dunwiddie y Haas 1985; Wu y Saggau, 1997).

Los canales de Ca^{2+} tipo N son importantes en anfibios, reptiles y aves ya que la aplicación de ω -CgTx-GVIA (0.5 μM), bloquea más del 70% del total de la corriente de Ca^{2+} presináptica (Cox y Dunlap 1992; Boland, et al., 1994; Manira y Bussières 1997).

Se ha reportado un bloqueo reversible para ω -CgTx-GVIA en diversos tipos celulares, incluyendo las neuronas espinosa medianas neostriatales. Ambas corrientes son similares en su cinética pero difieren en su dependencia al voltaje y en su estado estable. Se ha sugerido, que este comportamiento puede deberse a la actividad de subtipos de canal de Ca^{2+} tipo N, por una variación en la transcripción de la subunidad α_{1B} que confiere diferente afinidad a la ω -CgTx-GVIA. También puede haber coexpresión de las subunidades β y/o $\alpha_2\gamma$ con la subunidad α_{1B} , lo que puede alterar su unión con ω -CgTx-GVIA. Asimismo, una modificación postraducciona en las subunidades del canal de Ca^{2+} (glicosilación en una de las subunidades del canal de Ca^{2+}) (Mermelstein y Surmeier, 1997).

Este trabajo muestra que al aplicar ω -CgTx-GVIA (1 μM) aumenta la relación S_2/S_1 , lo que indica que los canales de Ca^{2+} tipo N localizados en las aferentes al neostriado participan en la liberación de glutamato. Reportes previos en estas aferentes muestran un incremento en la FPP al aplicar esta toxina (Barral, et al., 1999) y una disminución del 63% en la espiga poblacional ortodrómica (Bargas, et al., 1998). En sinaptosomas cerebrocorticales

de rata este antagonista reduce la liberación de glutamato en un 47.7% (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997).

El baclofen (2 μ M) en presencia de ω -CgTx-GVIA (1 μ M), incrementa la FPP, lo que indica que los canales de Ca^{2+} tipo N localizados en las aferentes corticoestriatales participan en la liberación del neurotransmisor pero no son modulados por la activación del receptor $GABA_B$, ya que esta toxina no ocluye el incremento en la FPP producido por baclofen.

En contraste, en cultivos de neuronas de hipocampo (Scholz y Miller, 1991), en neuronas ganglionares de la raíz dorsal del pollo (Cox y Dunlap, 1992) y en las neuronas de la médula espinal de la rata (Mintz y Bean, 1993), el receptor $GABA_B$ modula los canales de Ca^{2+} tipo N.

Al bloquear los canales de Ca^{2+} tipo P con ω -AgTx-TK (20 nM), aumenta la FPP, lo que sugiere que estos canales participan en la liberación del neurotransmisor en las aferentes glutamatérgicas al neostriado. Estudios previos en estas aferentes han reportado un aumento en la FPP al aplicar ω -AgTx-TK (10-30 nM) (Barral, et al., 1999). Asimismo, en la terminal presináptica del cáliz de Held, se ha reportado que la aplicación de ω -AgTx-TK (5nM) bloquea más de 50% de la corriente de Ca^{2+} , lo que sugiere que la liberación del neurotransmisor es mediada exclusivamente por canales de Ca^{2+} tipo P (Forsythe, et al., 1998).

Encontramos que la ω -AgTx-TK (20 nM) no bloquea el incremento en la FPP producida por baclofen (2 μ M), lo que sugiere que los canales de Ca^{2+} tipo P no son modulados por la activación del receptor $GABA_B$.

La ω -AgTx-TK (50 nM) ocluye parcialmente el efecto del baclofen (2 μ M), probablemente porque a esta concentración se bloquea parte de la corriente de Ca^{2+} tipo Q.

Al bloquear los canales de Ca^{2+} tipo Q con ω -AgTx-TK (400 nM) aumenta la FPP de

manera significativa, lo que indica que estos canales participan de manera importante en la liberación del neurotransmisor en las aferentes al neocórtex. Estudios previos en estas aferentes han reportado que la aplicación de ω -AgTx-TK (100-200 nM) reduce la respuesta N_2 de la espiga poblacional S_1 en un 54 % (Bargas, et al., 1998), y con una concentración de 100 a 400 nM de ésta toxina se incrementa la FPP (Barral, et al., 1999).

Se ha reportado que los canales de Ca^{2+} tipo Q son de gran importancia en la liberación de glutamato en el SNC (Takahashi y Momiyama, 1993; Teramoto, et al., 1995).

La transmisión sináptica glutamatérgica en las neuronas CA3 y CA1 de hipocampo es mediada principalmente por canales de Ca^{2+} tipo Q, ya que con una concentración de 1 μ M de ω -AgTx-TK se bloquea el 85 % de la transmisión sináptica (Wheeler, et al., 1994). Por otro lado en sinaptosomas cerebrocorticales de rata se ha mostrado que 200 nM de este péptido reduce la liberación del glutamato evocada por KCl en un 70.4 % (Vázquez y Sánchez-Prieto, 1997).

El antagonista del canal de Ca^{2+} tipo Q, la ω -AgTx-TK (400 nM) bloquea el incremento en la FPP producido por baclofen (2 μ M) de manera casi total, lo cual indica que el baclofen produce inhibición presináptica a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} tipo Q.

En las terminales nerviosas cerebrocorticales de rata, se encontró que el receptor $GABA_B$ modula los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Perkinton y Sihra, 1998).

El histograma de la gráfica 7 muestra que los canales de Ca^{2+} tipo N y P no son modulados por la activación de los receptores $GABA_B$ en las aferentes neocórtexiales, ya que el incremento en la FPP no presenta diferencias significativas con respecto al control al ($P > 0.327$ prueba de U-Mann-Whitney).

Se observa que la ω -AgTx-TK (50 nM) bloquea parcialmente el efecto modulador del baclofen ($P < 0.002$). Este resultado puede deberse a que la concentración utilizada de esta

toxina bloqueó una fracción de las corrientes de Ca^{2+} tipo Q. El receptor GABA_β modula las corrientes de Ca^{2+} tipo Q ya que la ω -AgTx-TK (400 nM) bloquea casi totalmente el efecto modulador del baclofen ($P < 0.005$).

VII CONCLUSIONES

Los canales de Ca^{2+} que participan en la liberación de glutamato en las aferentes glutamatérgicas al neostriado son los P/Q y N, ya que una fracción de la liberación del neurotransmisor glutamato es inhibida al aplicar antagonistas específicos para estos canales (Bargas, et al., 1998). La participación de estos canales en la liberación es aquí confirmada.

Los resultados demuestran que la activación del receptor GABA_B por baclofen, inhibe la liberación del neurotransmisor en las aferentes glutamatérgicas al neostriado, por el aumento en la relación S_2/S_1 (FPP), lo que sugiere que la inhibición es presináptica (Dunwiddie y Hass 1985).

La activación del receptor GABA_B inhibe la liberación del neurotransmisor glutamato, a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} tipo Q, ya que la ω -Aga-TK (400 nM), antagonista específico de estos canales, es capaz de ocluir el incremento en la FPP producida por baclofen.

La modulación presináptica corticoestriatal tiene importantes consecuencias en la transferencia de información de la corteza al neostriado ya que permite regular la excitación glutamatérgica, y por tanto la actividad funcional del neostriado. Una excesiva transmisión glutamatérgica puede causar muerte neuronal y producir cambios neuroquímicos similares a los observados en las enfermedades degenerativas (Bonanno, et al., 1998).

VIII ANEXO

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido gamma-aminobutírico	(GABA)
Ácido γ -hidroxibutírico	(GHB)
Agatoxina-IVA	
ω -Agatoxina-IVA	(ω -AgTx-IVA)
Agatoxina-TK	
ω -Agatoxina-TK	(ω -AgTx-TK)
D-2-Amino-5-ácido fosfonovalérico	(APV)
3-amino-2-hidroxi-2-(4-clorofenil)-ácido propanosulfónico	(Saclofen)
α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-ácido propiónico	(AMPA)
3-aminopropano ácido sulfónico	(APS)
Baclofen	(β p-clorofenil GABA)
Canales de calcio de alto umbral de activación	(HVA)
Canales de calcio de bajo umbral de activación	(LVA)
Canales de K ⁺ de rectificación entrante	(Kir: IRK, GIRK)
6-ciano-7-nitroquinoxalina-2, 3-diona	(CNQX)
Colina acetiltransferasa	(ChAT)
Conotoxina-GVIA	
ω -Conotoxina-GVIA	(ω -CgTx-GVIA)
Deshidrogenasa del semialdehído succínico	(DHSAS)
Dibutirato de forbol	(PDBu)
Dinorfina	(DYN)
Encefalinas	(ENK)
Facilitación por Pulsos Pareados	(FPP)
GABA transaminasa	(GABA-T)
Globo pálido externo	(GPe)
Globo pálido interno	(GPi)
Globo pálido ventral	(GPv)
Glutamato descarboxilasa	(GAD)
Glutamato sintetasa	(GluSint)

Masa molecular relativa	(Mr)
Neuropéptido Y	(NPY)
N-metil-D-aspartato	(NMDA)
Núcleo Caudado	(Cd)
Núcleos pedúnculo pontinos	(PPN)
Núcleo putamen	(Put)
Núcleo subtalámico	(STN)
Óxido nítrico	(NO)
Potencial postsináptico excitatorio	(EPSP)
Potencial postsináptico inhibitorio	(IPSP)
Proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina (CaM II)	
Receptor metabotrópico de glutamato	(mGluR)
Somatostatina	(SOM)
Substancia nigra pars compacta	(SNc)
Substancia nigra pars reticulata	(SNr)
Sustancia P	(SP)
Tetraetilamonio	(TEA)
4,5,6,7-tetraidroisoxazolo [5, 4-c] piridin-3-ol (THIP)	
Tetrodotoxina	(TTX)
Toxina Pertussis	(PTX)
Vesícula sináptica	(VS)

IX REFERENCIAS

- Adams ME Mintz IM Reily MD Thanabla V and Bean BP (1993). Structure and properties of ω -Agatoxin-IVB, a new antagonist of P-Type calcium channels. **Molecular Pyharmacology**. 44: 681-688.
- Adams ME and Olivera B (1994). Neurotoxins: overview of an emerging research technology. **TINS**. 17 (4): 151-155.
- Adler EM Augustine GJ Duffy SN and Charlton MP (1991). Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. **J. Neurosci**. 11: 1496-1507.
- Albin RL Young AB and Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. **TINS**. 12: 366-375.
- Aldrich RW Getting PA and Thompson SH (1979). Mechanism of frequency-dependent broadening of molluscan neurone soma spikes. **J. Physiol**. 291: 531-544.
- Alexander G DeLong MR and Strick PL (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Ann. Rev. Neurosci**. 9: 357-381.
- Andreasen MS and Hablitz JJ (1995). Paired-pulse facilitation in the dentate girus: A patch-clamp study in rat hippocampus *in vitro* **J. Neurosci**. 72: 326-336.
- Andrew RD and Dudek FE (1985). Spike broadening in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamic slices. **Brain Res**. 334: 176-179.
- Bargas J Howe A Eberwine J Cao Y and Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. **The Journal of Neuroscience**. 14 (11): 6667-6686.
- Bargas J and Galarraga E (1995). Firing response modulation in neostriatal projection neurons by cholinergic and dopaminergic agonists. **En: Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function**. Ed. by Ariano MA and Surmeier DJ. pp.183-191.
- Bargas J Ayala XG Hernández E and Galarraga E (1998). Ca^{2+} -channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. **Brain Research Bulletin**. 45 (5): 521-524.
- Barral J Galarraga E and Bargas J (1999). Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} -channels. **Brain Research Bulletin**. 49 (4): 284-289.
- Barrett EE and Stevens CF (1972). The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction. **J. Physiol**. 227: 691-708.

- Betz WJ (1970). Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. **Journal of Physiology.** 206: 629-644.
- Birnbaumer L Campbell KP Catterall WA Harpold MM Hofmann F Horne WA Mori Y Schwartz A Snutch TP and Tanabe T (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. **Neuron.** 13: 505-506.
- Bittner GD and Baxter DA (1983). Intracellular recordings from synaptic terminals during facilitation of transmitter release. **Soc. Neurosci. Abstr.** 9: 883.
- Blaustein MP Ratzlaff RW and Schweitzer ES (1978). Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. II Kinetic properties of the nonmitochondrial Ca²⁺ sequestration mechanism. **J. Gen. Physiol.** 72: 43-66.
- Bolam JP Wainer BH and Smith AD (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. **Neuroscience.** 12: 711-718.
- Boland LM Morrill JA and Bean BP (1994). ω -conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. **J. Neurosci.** 14: 5011-5027.
- Bonanno G and Raiteri M (1993). γ -Aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABA_B receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 265: 765-770.
- Bonanno G Fassio A Sala R and Raiteri M (1998). GABA_B receptors as potential targets for drugs able to prevent excessive excitatory amino acid transmission in the spinal cord. **European Journal of Pharmacology.** 362: 143-148.
- Bourinet E Soong TW Stea A and Snutch TP (1996). Determinants of the G-protein dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 1486-1491.
- Bowery NG (1993). GABA_B receptor pharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 33: 109-147
- Brown AM (1993). Membrane-delimited cell signaling complexes: direct ion channel regulation by G proteins. **Journal of Membrane Biology.** 131: 93-104.
- Calabresi BP Mercuri NB Murtas and Bernardi G (1991). Involvement of GABA systems in feedback regulation of glutamate and GABA-mediated synaptic potentials in rat neostriatum. **Journal of Physiology.** 440: 581-599.
- Calabresi BP Mercuri NB Stefani MD Bernardi MD (1992). Physiological Role of GABA_B Receptors in the Mammalian Neostriatum.
- Calabresi BP Mercuri NB and Bernardi G (1993). Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. **Progress in Brain Research.** 99: 299-308.

- Carbone E and Swandulla D (1989). Neuronal calcium channels: Kinetics, blockade and modulation. **Prog. Biophys. Molec. Biol.** 54: 31-58.
- Ceccarelli B and Hurlbut WP (1980). Ca^{2+} -dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **J. Cell Biol.** 87: 297-303.
- Chan KY Leung KS and Yung W (1998). Differential expression of pre- and postsynaptic GABA_B receptors in rat substantia nigra pars reticulata neurones. **European Journal of Pharmacology.** 349: 187-197.
- Chang HT Wilson CJ and Kitai ST (1982). A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis. **J. Comp. Neurol.** 208: 107-126.
- Charlton MP Smith SJ and Zucker RS (1982). Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse. **J. Physiol.** 323: 173-193.
- Chen G and Van den Pol AN (1998). Presynaptic GABA_B autoreceptor modulation of P/Q-Type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. **The Journal of Neuroscience.** 18 (5): 1913-1922.
- Chuang HH Jan YN and Jan LY (1997). Regulation of IRK3 inward rectifier K⁺ channel by M1 acetylcholine receptors and intracellular magnesium. **Cell.** 89: 1121-1132.
- Colmers WF and Williams JT (1988). Pertussis toxin treatment discriminates between pre- and postsynaptic actions of baclofen in rat dorsal raphe nucleus *in vitro*. **Neurosci. Letts.** 93: 300-306.
- Cooper JR Bloom FF and Ruth RH (1996). **The Biochemical Basis of Neuropharmacology.** 7 Ed. New York Oxford pp: 126-162.
- Cordingley GE and Weight FF (1986). Non-cholinergic synaptic excitation in neostriatum: Pharmacological evidence for mediation by a glutamate-like transmitter. **Br. J. Pharmacol.** 88: 847-856.
- Cox DH and Dunlap K (1992). Pharmacological discrimination of N-type from L-type calcium current and its selective modulation by transmitters. **J. Neurosci.** 12: 906-914.
- Creager R Dunwiddie T and Lynch G (1980). Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the *in vitro* rat hippocampus. **Journal of Physiology.** 299: 409-424.
- Davletov BA and Südhof CT (1994). Ca^{2+} -dependent conformational change in synaptotagmin I. **The Journal of Biological Chemistry.** 269: 28547-28550.
- Debanne D Guérineau NC Gähwiler BH and Thompson SM (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. **Journal of Physiology.** 491: 163-176.

- De Camilli P and Takei K (1996). Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. **Neuron**. 16: 481-486.
- Deisz R Billard JM and Zieglgansberger W (1992). Evidence for two types of GABA_B receptors located pre- and postsynaptically in the rat neocortical slice in vitro. **J. Physiol.** 446: 514.
- Del Castillo J and Katz B (1954). Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. **Journal of Physiology**. 124: 574-585.
- De Waard M Liu H Walker D Scott ES Gurnett AC and Campbell PK (1997). Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. **Nature**. 385: 446-450.
- De Weille JR Schweitz H Maes P Tartar A and Lazdunski M (1991). Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**. 88: 2437-2440.
- DiFiglia M Pasik P and Pasik T (1976). A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. **Brain Res**. 114: 245-256.
- Dittman JS and Regehr WG (1996). Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. **J. Neurosci**. 16: 1623-1633.
- Dodge FA and Rahamimoff R (1967). Cooperative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular Junction. **J. Physiol**. 193: 419-432.
- Dolphin AC (1995). Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. **Experimental Physiology**. 80: 1-36
- Dolphin AC (1996). Facilitation of Ca²⁺ current in excitable cells. **Trends Neurosci**. 19: 35-43.
- Dudel J (1981). The effect of reduced calcium on quantal unit current and release at the crayfish neuromuscular junction. **Pflügers Arch**. 391: 35-40.
- Dunlap K Luebke JI and Timothy JT (1995). Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. **Trends Neurosci**. 18: 89-98.
- Dunwiddie TV and Haas HL (1985). Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action. **J. Physiol. Lond**. 369: 365-377.
- Dutar P and Nicoll RA (1988a). A physiological role for GABA-B receptors in the central nervous system. **Nature**. 332: 156-158.

- Dutar P and Nicoll RA (1988b). Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. **Neuron**. 1: 585-591.
- Feldman DH Olivera BM and Yoshikami D (1987). Omega *Conus geographus* toxin: a peptide that blocks calcium channels. **FEBS Lett**. 2: 295-300.
- Ford EC Skiba PN Bae H Daaka Y Reuveny E Shekter RL Rosal R Weng G Yang C Iyengar R Miller JR Jan YL Lefkowitz JR and Hamm EH (1998). Molecular basis for Interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. **Science**. 280: 1271-1273.
- Forsythe ID Tsujimoto T Barnes Davies M Cuttle MF and Takahashi T (1998). Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. **Neuron**. 20: 797-807.
- Fossier P Tauc L and Baux G (1999). Calcium transients and neurotransmitter release at an identified synapse. **Trends Neurosci**. 22: 161-166.
- Froestl W Mickel SJ Hall RG von Sprecher G Strub D Baumann PA Brugger F Gentsch C Jaekel J Olpe HR Rihs G Vassout A Waldmeier PC and Bittiger H (1995). A phosphinic acid analogues of GABA. I New potent and selective GABA_B agonists. **J. Med. Chem**. 38: 3297-3312.
- Gage PW (1992). Activation and modulation fo neuronal K⁺ Cnannels by GABA. **Trends Neurosci**. 15: 46-51.
- Giotti A Luzzi S Spagnesi S and Zilletti I (1983). Homotaurine: a GABA_B antagonist in guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol**. 79: 855-862.
- Gorvel J-P Chavrier P Zerial M and Gruenberg J (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. **Cell**. 64: 915-925.
- Graham B and Redman S (1994). A stimulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition. **J. Neurophysiol**. 71: 538-549.
- Graybiel AM and Ragsdale CW (1983). Biochemical anatomy of the striatum. In: **Chemical Neuroanatomy** (Emson, PC ed.) New York: Raven Pres. pp. 427-503.
- Grillner S Deliagina T Ekeberg O El Manira A Hill RH Lansner A Orlovsky GN and Wallén P (1995). Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. **Treds Neurosci**. 18: 270-279.
- Harrison NL (1990). On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurones. **J. Physiol**. 422: 433-446.
- Herlitze S Garcia DE Mackie K Hille B Scheuer T and Catterall WA (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein subunits. **Nature**. 280: 258-262.

- Hernández-Echeagaray E Galarraga E and Bargas J (1998). α -chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. **Neuropharmacology**. 37: 1493-1503.
- Hess P (1990). Calcium channels in vertebrate cells. **Ann. Rev. Neurosci.** 13: 337-356.
- Hille B (1992). **Ionic Channels of Excitable Membranes**. Sunderland MA: Sinauer. pp. 83-115.
- Howson W Mistry J Broekman M and Hills JM (1993). Biological activity of 3 aminopropyl (methyl) phosphinic acid, a potent and selective GABA_B agonist with CNS activity. **Bioorganic Med. Chem. Lett.** 3: 515-518.
- Huang CL Slesinger PA Casey BJ Jan YN and Jan LY (1995). Evidence that direct binding of G $\beta\gamma$ to the GIRK1 G protein gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. **Neuron**. 15: 1133-1143.
- Hubbard JI Jones SF and Landau EM (1968). On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. **J. Physiol.** 196: 75-78.
- Huguenard JR (1996). Low threshold calcium currents in central nervous system neurons. **Annu. Rev. Physiol.** 58: 329-349.
- Huston E Cullen G Sweeney MI Pearson H Fazeli MS and Dolphin AC (1993). Pertussis toxin treatment increases glutamate release and dihydropyridine binding sites in cultured rat cerebellar granule neurons. **Neuroscience**. 52: 787-798.
- Ikeda SR (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein subunits. **Nature**. 380: 255-258.
- Isaacson S (1998). GABA_B receptor-mediated modulation of presynaptic currents and excitatory transmission at a fast central synapse. **The American Physiological Society**. 1571-1576.
- Johnston D and Wu SS (1995). **Fundations of Cellular Neurophysiology**. Cambridge, Massachusetts. London. England. pp. 287-357.
- Kamatchi LG and Ticku KM (1990). Functional coupling of presynaptic GABA_B receptors with voltage-gated Ca²⁺ channel: regulation by protein kinases A and C in cultured spinal cord neurons. **Molecular Pharmacology**. 38: 342-347
- Katz B and Miledi R (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. **J. Physiol.** 195: 481-492.
- Katz B and Miledi R (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. **J. Physiol.** 207: 789-801.

- Kaupmann K Huggel K Heid J Flor J Bischoff S Mickel J McMaster G Angst C Bittiger H Froesti W and Bettier B (1997). Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. **Nature**. 386: 239-246.
- Kawaguchi Y Wilson CJ Sarah J Augood and Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. **Trends Neurosci**. 18: 524-535.
- Kerr DIB Ong J Prager RH Gynther BD and Curtis DR (1987). Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. **Brain Res**. 405: 150-154.
- Kerr DIB Ong J Johnston GAR Abbenante J and Prager RH (1988). 2-Hydroxy-saclofen: an improved antagonist: at central and peripheral GABA_B receptors. **Neurosci. Lett**. 92: 92-96.
- Kim YI and Dudek FE (1992). Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: inhibitory synaptic mechanisms. **J. Physiol (Lond)**. 458: 247-260.
- Kita H Kosaka T and Heizmann CW (1990). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. **Brain Res**. 536: 1-15.
- Kombian SB Zidichouski AJ and Pittman QJ (1996). GABA_B receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus *in vitro*. **Journal of Neurophysiology**. 76 (2): 1166-1179.
- Kuwada M Teramoto T Kumagaye KY Nakajima K Watanabe T Kawai T Kawakami Y Niidome T Sawada K Nishizawa Y and Katayama K (1994). ω -agatoxin-TK containing D-serine at position 46, but not synthetic ω -L-Ser⁴⁶ agatoxin-TK, exerts blockade of P-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. **Mol. Pharmacol**. 46: 587-593.
- Langer LS (1997). 25 Years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. **TIPS**. 18: 95-99.
- Li C Takei K Geppert M Daniell L Stenius K Chapman ER Jahn R De Camilli P and Südhof CT (1994). Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca²⁺/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C. **Neuron**. 13: 885-898.
- Lovinger DM Merrit A and Reyes D (1994). Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. **Neuroscience**. 62: 31-40.
- Lovinger MD and Tyler E (1996). Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. **International review of neurobiology**. 39: 77-111.
- Magleby KL (1987). Short-Term Changes in Synaptic Efficacy. En: **Function Synaptic**. (Ed: Edelman GM Gall WE and Cowan M).

- Malenka RC and Kocsis JD (1988). Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied *in vitro*. **The Journal of Neuroscience**. 8(10): 3750-3756.
- Manabe T Wyllie DJA Perkel DJ and Nicoll RA (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects of paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. **J. Neurophysiol.** 70: 1451-1459.
- Manira and Bussières (1997). Calcium channel subtypes in lamprey sensory and motor neurons. **The American Physiological Society**. 78: 1334-1340.
- Matthews G (1996). Neurotransmitter release. **Annu. Rev. Neurosci.** 19: 219-233.
- Mermelstein G and Surmeier D (1997). A calcium channel reversibly blocked by ω -conotoxin GVIA lacking the class D α_1 subunit. **Neuro. Report.** 8: 485-489.
- Miledi R and Thies R (1971). Tetanic and posttetanic rise in frequency of miniature endplate potentials in low-calcium solutions. **J. Physiol.** 212: 245-257.
- Miljanich P and Ramachandran J (1995). Antagonists of neuronal calcium channels: Structure, Function, and Therapeutic Implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 35: 707-734.
- Miller RJ (1992). Voltage sensitive Ca^{2+} channels. **J. Biol. Chem.** 267: 1403-1406.
- Miller RJ (1998). Presynaptic receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 38: 201-227.
- Mintz IM Adams ME and Bean BP (1992a). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. **Neuron.** 9: 85-95.
- Mintz IM Venema VJ Swiderek KM Lee TD Bean BP and Adams ME (1992b). P-type calcium channels blocked by the spider toxin, ω -Aga-IVA. **Nature (Lond).** 355: 827-829.
- Mintz IM and Bean BP (1993). GABA_B receptor inhibition of P-type Ca^{2+} channels in central neurons. **Neuron.** 10: 889-898.
- Mintz IM Sabatini BL and Regehr WG (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. **Neuron.** 5: 675-688.
- Misgeld U Bijak M and Jarolimek W (1995). A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian CNS. **Prog. Neurobiol.** 46: 201-206.
- Mott DD and Lewis DV (1994). The pharmacology and function of central GABA_B receptors. **Int. Rev. Neurobiol.** 36: 97-223.

- Namkung Y Smith MS Lee BS Kim LH Chin H Scheller HR Tsien WR and Shin SH (1998). Targeted disruption of the Ca²⁺ channel β 3 subunit reduces N- and L-type Ca²⁺ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca²⁺ channels in neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 12010-12015.
- Newberry NR and Nicoll RA (1985). Comparison of the action of baclofen with α -aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells *in vitro*. **J. Physiol.** 360: 161-185.
- Nisenbaum ES Berger WT and Grace AA (1992). Presynaptic modulation by GABAB receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neocortical neurons. **Journal of Neurophysiology.** 67 (2): 477-481.
- Nisenbaum ES, Berger TW and Grace AA (1993). Depression of glutamatergic and GABAergic synaptic responses in striatal spiny neurons by stimulation of presynaptic GABA_B receptors. **SYNAPSE.** 14: 221-242.
- Olpe HR Karlsson G Pozza MF Brugger F Steinmann M Van Riezen H Fagg G Hall RG Froestl W and Bittiger H (1990). CGP 35348: a centrally active blocker of GABA_B receptors. **Eur. J. Pharmacol.** 187: 27-38.
- Olpe HR Steinmann M Ferrat T Pozza MF Greiner K Brugger F Froestl W Mickle SJ and Bittiger H (1993). The actions of orally active GABA_B receptor antagonists on GABAergic transmission *in vivo* and *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.** 233: 179-186.
- Parent A (1990). Extrinsic connections of the basal ganglia. **Trends Neurosci.** 13: 254-258.
- Park MR Lighthall JW and Kitai ST (1980). Recurrent inhibition in the rat neostriatum. **Brain Res.** 194: 359-369.
- Parnas H Dudel J and Parnas I (1982). Neurotransmitter release and its facilitation in crayfish. I. Saturation Kinetics of release and of entry and removal of calcium. **Pflügers Arch.** 393: 1-14.
- Perez-Reyes E and Schneider T (1995). Molecular biology of calcium channels. **Kidney Int.** 48: 1111-1124.
- Perez-Reyes E Cribbs LL Daud A Lacerda AE Barclay J Williamson MP Fox M Rees M and Lee JH (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. **Nature.** 391: 896-900.
- Perkinton and Shira T (1998). Presynaptic GABA_B receptor modulation of glutamate exocytosis from rat cerebrocortical nerve terminals: receptor decoupling by protein kinase C. **Journal of Neurochemistry.** 70: 1513-1522.
- Pitler TA and Alger BE (1994). Differences between presynaptic and postsynaptic GABAB mechanisms in rat hippocampal pyramidal cells. **J. Neurophysiol.** 72: 2317-2327.

- Potier B and Dutar P (1993). Presynaptic inhibitory effect of baclofen on hippocampal inhibitory synaptic transmission involves a pertussis toxin-sensitive G-protein. **Eur. J. Pharmacol.** 231: 427-433.
- Pragnell M De Waard M Mori Y Tanabe T Snutch TP and Campbell KP (1994). Calcium channel subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the 1 subunit. **Nature** 368: 67-70.
- Precht W and Yoshida M (1971). Blockage of caudate-evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin. **Brain Res.** 32: 229-233.
- Quin N Platano D Olcese R Stefani E and Birnbaumer L (1997). Direct interaction of G with a C-terminal binding domain of the calcium channel 1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein coupled receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 8866-8871.
- Rahamimoff R (1968). A dual action of calcium ions on neuromuscular facilitation. **Journal of Physiology.** 195: 471-480.
- Rall W (1992). Path to biophysical insights about dendrites and synaptic function. (In **The Neurosciences: paths of Discovery II**). Ed. F Samson and Adelman G. Boston: Birkhauser.
- Rall W and Shepherd GM (1968). Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. **J. Neurophysiol.** 31: 884-915.
- Randall A and Tsien RW (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. **J. Neurosci.** 15: 2995-3012.
- Regan LJ (1991). Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. **J. Neurosci.** 11: 2259-2269.
- Roberts WM Jacobs RA and Hudspeth AJ (1990). Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. **J. Neurosci.** 10: 3664-3684.
- Rohrbacher J Jarolimek W Lewen A and Misgeld U (1997). GABA_B receptor-mediated inhibition of spontaneous inhibitory synaptic currents in rat midbrain culture. **J. Physiol. (Lond).** 500: 739-749.
- Sadikot AF Parent A and Francois C (1990). The centre median and parafacicular thalamic nucleo project respectively to the sensorimotor and associative-limbic striatal territories in the monkey. **Brain Res.** 510: 161-165.
- Sanchez-Prieto J Budd DC Herrero I Vazquez E and Nicholls DG (1996). Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. **Trends Neurosci.** 19: 235-239.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Scanziani M Capogna M Gähwiler BH and Thompson RF (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. **Neuron**. 9: 919-927.
- Scholtz KP Miller RJ (1991). GABA_B receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurons. **J. of Physiol (Lond)** 444: 669-686.
- Shepherd GM and Phil MD (1994). **Neurobiology**. 3rd. edition. New York. Oxford University Press. pp 122.
- Siegel GJ Agranoff BW Alberts RW Molinoff PB (1994). **Basic Neurochemistry**. 4 ta edition Reven Press New York. pp 313.
- Simon SM and Llinás RR (1985). Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. **Biophys. J.** 48: 485-498.
- Sivilotti L and Nistri A (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous sytem. **Prog. Neurobiol.** 36: 35-92.
- Snutch TP and Reiner PB (1992). Ca²⁺ channels: diversity of form and function. **Curr. Opin. Neurobiol.** 2: 247-253.
- Sodickson DL and Bean BP (1996). GABA_B receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. **J. Neurosci.** 16: 6374-6385.
- Soltesz I Haby M Leresche N and Crunell V (1988). The GABA-B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺ dependant IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. **Brain Res.** 448: 351-354.
- Stahi B Fischer von Mollard G Walch-SolimenaC and Jahn R (1994). GTP Cleavage by the small GTP binding protein Rab 3A Is associated with exocytosis of synaptic vesicles Induced by α -latrotoxin. **J. Biol. Chem.** 269: 24770-24776.
- Stanley FE (1997). The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. **TINS.** 20: 404-409.
- Südhof CT (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature.** 375: 645-653.
- Suzdak PD Schwartz RD Skolnick P and Paul SM (1986) Ethanol stimulates gamma aminobutyric acid receptor-mediated choride transport in rat brain synoptoneurosomes. **Proc. Natl. Acad. Sc. USA.** 83: 4071-4075.
- Takahashi T and Momiyama A (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. **Nature.** 366: 156-158.

- Takahashi T Kajikawa Y and Tsujimoto T (1998). G-protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA_B receptor. **The Journal of Neuroscience**. 18 (9): 3138-3146.
- Tanabe Y Takeshima H Mikami A Flockerzi Takahashi H and Kangawa K (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. **Nature**. 328: 313-318.
- Teramoto T Niidome T Miyagawa T Nishizawa Y Katayama K and Sawada K (1995). Two types of calcium channels sensitive to ω -agatoxin-TK, in cultured rat hippocampal neurons. **NeuroReport**. 6: 1684-1688.
- Teramoto T Niidome T Kimura M Ohgoh M Nishizawa Y Katayama K Mayumi T and Sawada K (1997). A novel type of calcium channel sensitive to ω -agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. **Brain Research**. 756: 225-230.
- Thies RE (1965). Neuromuscular depression and the apparent depletion of transmitter in mammalian muscle. **J. Neurophysiol.** 28: 427-442.
- Thompson SM and Gähwiler BH (1992). Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. **J Physiol (Lond)**. 451: 329-345.
- Timothy M De Lorey and Osen RW (1994). GABA and Glycine. En: **Basic Neurochemistry**. (Ed: Siegel MD Agranoff MD Wayne A Molinoff). 5ta. Ed. Reven Press New York pp: 389-397
- Toth PT Shekter LR Ma GH Philipson LH and Miller RJ (1996). Selective G-protein regulation of neuronal calcium channels. **J. Neurosci.** 16: 4617-4624.
- Travagli RA Ulivi M and Wojcik WJ (1991). Gamma-Aminobutyric acid-B receptors inhibit glutamate release from cerebellar granule cells: consequences of inhibiting cyclic AMP formation and calcium influx. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 258: 903-909.
- Vázquez E and Sánchez-Prieto J (1997). Presynaptic Modulation of Glutamate Release Targets Different Calcium Channels in Rat Cerebrocortical Nerve Terminals. **European Journal of Neuroscience**. 9: 2009-2018.
- Wall and Dale (1994). GABA_B receptors modulate an ω -conotoxin-sensitive calcium current that is required for synaptic transmission in the *Xenopus* embryo spinal cord. **The Journal of Neuroscience**. 14 (10): 6248-6255.
- Wheeler DB Randall H and Tsien R W (1994). Roles of N - type and Q - type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. **Science**. 264 pp: 107-113.
- White G Lovinger DM and Weight FF (1989). Transient low-threshold Ca²⁺ current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 89: 6802-6806.

- Williams SR Turner JP and Crunelli V (1995). Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABA_B receptor mediated hyperpolarization. **Neuroscience**. 66: 133-141.
- Wilson CJ (1998). The basal ganglia. En: **The Synaptic Organization of the Brain** 4th ed. (Ed: Shepherd GM) . Oxford U. P., New York. pp: 329-375.
- Wu L and Saggau P (1995). GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. **J. Physiol. (Lond.)**. 485: 649-657.
- Wu L and Saggau P (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release . **Trends Neurosci**. 20: 204-212.
- Zamponi WG and Snutch PT (1998). Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. **Current Opinion in Neurobiology**. 8: 351-356.
- Zhang L Valiante TA and Carlen PL (1993). Contribution of the low-threshold T-type calcium current in generating the post-spike depolarizing afterpotential in dentate granule neurons of immature rats. **J. Neurophysiol**. 70: 401-457.
- Zhang JF Ellinor PT Aldrich RW and Tsien RW (1996). Multiple structural elements in voltage-dependent Ca²⁺ channels support their inhibition by G proteins. **Neuron** 17: 991-1003.
- Zucker RS (1989). Short-term plasticity. **Annu. Rev. Neurosci**. 12: 13-31.