

00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**MODULACION PRESINAPTICA DE LAS AFERENTES
EXCITATORIAS GLUTAMATERGICAS AL
NEOESTRIADO DE LA RATA**

201003

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGIA

P R E S E N T A :
JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO

DIRECTOR DE LA TESIS: DR. JOSE BARGAS DIAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la realización de este trabajo se contó con facilidades por parte de la **E.N.E.P. Iztacala** dentro del **Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de Tiempo Completo de la U.N.A.M. (PASPA)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)**; así como por parte de la **División de Investigación y del Proyecto Neurociencias**. Asimismo se recibieron apoyos por parte de la **Facultad de Ciencias** para la asistencia a congresos.

Este trabajo fue realizado con recursos aportados por la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** de la **Universidad Nacional Autónoma de México (IN201597)**.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio 125-N del Instituto de Fisiología Celular, así como en el laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias (Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y Educación) de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, en la Universidad Nacional Autónoma de México durante el periodo comprendido de Agosto de 1997 a Diciembre de 2000.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. José Bargas Díaz**, Jefe del Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular.

A LA MEMORIA DE MI PADRE

En las recias luchas de la vida,
Cuando mi pobre voluntad flaqueo
Quién sino tú me alentaste en la caída
Quien sino tú me ayudo en la pelea...

A MI MADRE

Mírame madre y por tu amor no llores
Sí esclavo de mi edad y mis doctrinas
Tú mártir corazón llene de espinas
Piensa que nacen entre espinas...

. Flores

José Martí

A MIS PEQUEÑOS HIJOS PAOLA Y RENÉ

La búsqueda de la verdad puede ser dura o
fácil, pues es evidente que nadie puede po-
seerla enteramente o carecer de ella.
Pero cada uno añade un poco a nuestro cono-
cimiento de la naturaleza, y a partir de todo el
conjunto de datos se alza cierto esplendor

**A ARACELI
Y SU MARAVILLOSA FAMILIA**

Sí te quiero es por que sos mi amor mi cómplice y todo
Y en la calle codo a codo somos mucho más que dos

Tus manos son mi caricia, mis acordés cotidianos
Te quiero porque tus manos trabajan por la justicia

Tus ojos son mi conjuro contra la mala jornada
Te quiero por tu mirada que mira y siembra futuro

Tu boca que es tuya y mía, tú boca no se equivoca
Te quiero por que tu boca sabe gritar rebeldía

Y por tu rostro sincero, y tu paso vagabundo
Tu llanto por el mundo Porque sos pueblo te quiero

Y porque amor no es aureola, ni cándida moraleja
Y porque somos pareja que sabe que no esta sola

Te quiero en mi paraíso, es decir que en mi país
La gente viva feliz aunque no tengan permiso

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial a mis tutores José Bargas y Elvira Galarraga por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por la paciencia mostrada para guiarme con pasos firmes a través del difícil camino de la investigación, y por su gran esfuerzo para libramme de las garras de la ignorancia

También quiero expresar mi agradecimiento a Thalía Harmony, quien a lo largo de más de veinte años me ha brindado su apoyo y me ha distinguido con su amistad.

La culminación de este trabajo de Tesis se debe en gran medida a dirección y valiosos consejos que en diferentes etapas de mi vida he recibido por parte de mis mentores, en particular de Javier Flores López y Hugo Aréchiga.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, en especial a Xochitl Ayala, Jorge Flores, Salvador Hernández, Elizabeth Hernández, Arturo Reyes y Juan Carlos Pineda. Que me enseñaron las técnicas de registro, y sin cuyos consejos este trabajo no se hubiera llevado a cabo.

A mis compañeros de la División de Investigación y del Proyecto Neurociencias de la E.N.E.P. Iztacala, en particular a Gloria Vilaclara, Jorge Bernal, Patricia Dávila, Erzsebeth Marosi. Quienes depositaron su confianza en mi trabajo, así como por todas las facilidades otorgadas para que este trabajo se haya podido realizar.

Al subcomité de becas de la E.N.E.P. Iztacala, en particular a Lourdes Eguiluz, Ramón Moreno y Laura Evelia Torres, por todo el apoyo que me brindaron

A mis compañeros y amigos del Área de Zoología, en particular a Jorge Padilla, Marcela Ibarra, Sergio Stanford y Atahualpa de Sucre. Quienes me han siempre apoyado en mis tareas docentes y me han distinguido con su amistad.

A mis alumnos, de manera especial a aquellos contribuyeron a la realización de este trabajo: Francisco Poblette, Humberto Salgado, Silvia Toro y Ernesto Mendoza, de quienes he aprendido algunas de las lecciones más importantes mi vida.

Finalmente también quiero expresar mi profundo agradecimiento a los profesores que han tenido la ingrata tarea de revisar y evaluar mi desempeño académico a lo largo del Doctorado.

*Dra. Luisa Alba Lois
Dr. José Bargas
Dra. Sara Cruz Morales
Dra. María Luisa Fanjul
Dra. Elvira Galarraga
Dra. Hortensia Gonzalez
Dr. Salvador Hernández
Dr. Juan Manuel Mancilla
Dr. Luis Mediano*

INDICE	
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	2
RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
I CONSIDERACIONES INICIALES.....	5
La Sinapsis	5
Los Canales de Ca ²⁺	13
El papel del Ca ²⁺ en la Liberación.....	18
II CONSIDERACIONES FUNCIONALES	22
La neuromodulación	22
Papel de las Proteínas-G en la modulación	23
La modulación presináptica	24
III LOS GANGLIOS BASALES	29
La transmisión sináptica en el neocórtex	37
Modulación presináptica por los neurotransmisores y neuromoduladores usados en este estudio.....	38
Receptores Muscarínicos.....	38
Receptores GABAérgicos	41
HIPÓTESIS DE TRABAJO	44
OBJETIVOS	44
GENERALES ...	44
PARTICULARES.....	44
MATERIAL Y MÉTODOS	45
PREPARACIÓN	45
SISTEMA DE ESTIMULACIÓN Y REGISTRO	45
EL REGISTRO EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE CAMPO ..	46
FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO.....	49
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	52
DROGAS UTILIZADAS	54
RESULTADOS.....	55
MODULACIÓN PRESINÁPTICA: PAPEL DE LOS CANALES DE Ca ²⁺	55
MODULACIÓN PRESINÁPTICA. PAPEL DE LOS RECEPTORES COLINÉRGICOS.....	59
MODULACIÓN PRESINÁPTICA PAPEL DE LOS RECEPTORES GABAÉRGICOS.....	61
DISCUSIÓN GENERAL	63
CONCLUSIONES GENERALES.....	72
LITERATURA CITADA.....	73

Glosario de Términos

(*) Por sus siglas en Ingles

ACh	Acetilcolina
AMPA	α - amino - 3 - hidroxí - 5 - metil - isoxazole - 4 - propionato
AMP _c	monofosfato de adenosina cíclico (*)
APV	O 2-amino-5-phosphonopentanoate
ATP	Trifosfato de adenosina (*)
BayK 8644	metil - 1,4 - dihidro - 2,6 - dimetil - 3 - nitro - 4 - (trifluorometilfenil) - piridina - 5 - carboxi- lato
Cam II	Calcio Calmodulin kinasa II
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-NH ₂
DA	Dopamina
DAG	Diacyl glycerol
DAMGO	D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol ⁵ -enkephalin
DHP	1,4 Dihidropiridinas
DPDPE	D-Pen ² , D-Pen ⁵ -enkephalin
Dyn	Dinorfina
Enk	Encefalina
EPSP	Potencial postsináptico excitatorio (*)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (*)
GB	Ganglios basales
GDP	Guanosin difosfato (*)
Glu	Glutamato
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GTP	Guanosin trifosfato (*)
HVA	Canales de calcio de alto umbral (*)
IL	Núcleos intralaminares talámicos
IP3	Trifosfato de inositol
LVA	Canales de calcio de bajo umbral (*)
MD	Núcleo dorso mediano talámico
NEM	N etil maleimida
NMDA	N metil D aspartato
NOS	Oxido nítrico sintetasa (*)
NSF	Proteína de fisión sensible a (*)
Nt	Neurotensina
PK	Proteína kinasa (*)
PKA	Proteína kinasa dependiente de AMP _c
PKC	Proteína kinasa C
PLC	Fosfolipasa C (*)
PPF	Facilitación por pulso pareado (*)
PSD	Densidad Postsináptica
SNAP	Proteína de unión soluble a NSF (*)
SNARE	Receptores de proteínas solubles unidas a NSF (*)
SN _c	Substancia Nígra pars compacta
SNC	Sistema nervioso central
SN _R	Substancia Nígra pars reticulata
SP	Substancia P
STN	Núcleo subtalámico
TTX	Tetrodotoxina
VA	Núcleo ventral anterior talámico
VAMP	Proteína de membrana asociada a vesículas (*)
VDCC	Canales de calcio dependientes de Voltaje (*)
VL	Núcleo ventrolateral talámico
Ⓜ-AgTx IVA	Ⓜ Agatoxina IVA
Ⓜ-AgTx TK	Ⓜ Agatoxina TK
Ⓜ-CgTx GVIA	Ⓜ conotoxina GVIA
Ⓜ-CgTx MVIIC	Ⓜ conotoxina MVIIC

Resumen

Las neuronas se comunican unas con otras a través de la liberación de neurotransmisor y la subsiguiente acción postsináptica, sin embargo la eficacia del proceso de liberación de neurotransmisor puede ser influenciado por diversos factores que permiten que el fortalecimiento de la comunicación sináptica se vea continuamente modulado.

Se han postulado diferentes hipótesis para explicar la modulación presináptica. Una de las más atractivas se basa en el hecho de que la transmisión sináptica depende de la entrada de Ca^{2+} extracelular, cuando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) son bloqueados, por manipulaciones experimentales (p.e. bajo Ca^{2+} , bloqueo con Cd^{2+}), o por la acción de diversos moduladores que actúan sobre receptores presinápticos (p.e. GABA_B y muscarina). Otras hipótesis de la modulación presináptica se basan en que la reducción en la liberación de neurotransmisor se debe a la activación de conductancias de K^+ o Cl^- ; o a que los moduladores pudieran estar actuando sobre la maquinaria de liberación.

Es posible utilizar técnicas de registro extracelular para analizar eventos presinápticos con el paradigma experimental de facilitación por pulsos pareados (PPF). Con este protocolo, hemos podido establecer la existencia de diferentes tipos de canales de Ca^{2+} en las terminales nerviosas de la sinapsis corticoestriatal, los cuales pueden ser caracterizados farmacológicamente. La aplicación de toxinas selectivas que bloquean específicamente canales de Ca^{2+} (p.e. ω -Conotoxina GVIA y ω -Agatoxina TK) mostraron que los canales de Ca^{2+} tipo N y Q están presentes

en estas sinapsis, probablemente en la vecindad de la zona activa de la sinapsis, directamente involucrados en el proceso de liberación. La aplicación de antagonistas (Nitrendipina) y agonistas (Bay K 8644) de los canales de Ca^{2+} tipo L, mostraron que estos canales están presentes en la terminal corticoestriatal, pero éstos deben encontrarse alejados de la zona activa de la sinapsis. Probablemente contribuyen a la depolarización de la terminal después de la llegada del potencial de acción.

La activación de receptores muscarínicos y GABAérgicos producen inhibición presináptica en la sinapsis corticoestriatal. En ambos casos observamos que esta modulación presináptica se debe a una disminución en la entrada de Ca^{2+} extracelular. Experimentos de oclusión farmacológica revelaron que la acción de la muscarina y el baclofen se ven completamente ocluidos cuando los canales de Ca^{2+} tipo Q son bloqueados previamente.

En conclusión, la sinapsis corticoestriatal tiene canales de Ca^{2+} tipos L, N y Q. Los canales tipos N y Q están muy cercanos a la zona activa, mientras que los canales de calcio tipo L están en las terminales, pero lejos de la zona activa. Sin embargo, solamente los canales de Ca^{2+} tipo Q son susceptibles de ser modulados por la acción de agonistas colinérgicos (por receptores muscarínicos) y GABAérgicos (por receptores GABA_B). Otros mecanismos pudieran estar involucrados en la modulación presináptica de la sinapsis corticoestriatal.

Summary

Neurons communicate with each other through the release of certain neurotransmitters and the subsequent postsynaptic action. The efficiency of the transmitter release can be influenced by a number of factors that allow a constant modulation of the strength of the synaptic communication.

Several hypotheses have been postulated to explain the presynaptic modulation. The most attractive theory is based on the fact that synaptic transmission depends on the entry of extracellular Ca^{2+} , when voltage dependent Ca^{2+} channels (VDCC) are blocked by several experimental manipulations (e.g. low external Ca^{2+} , Cd^{2+} blockage), or by action of different modulators that activate presynaptic receptors (e.g. GABA_B , muscarine). Other hypotheses on the presynaptic modulation are based on the reduction of neurotransmitter release due to the activation of K^+ or Cl^- conductances, or on neuromodulators could act directly on the release machinery.

It is possible to use extracellular recording techniques to analyze presynaptic events by means of experimental paradigm of paired pulse facilitation (PPF). With this protocol we can establish the existence of different Ca^{2+} channels in corticostriatal synaptic endings that are characterized pharmacologically. The application of selective toxin peptides that block Ca^{2+} channels in a specific way (e.g. ω -Conotoxin GVIA and ω -Agatoxin TK) showed that N- and Q-type channels are present in these terminals, probably in the vicinity of the active zone of the synapse, directly involved in the release process. The ap-

plication of antagonist (nitrendipina) and agonist (Bay K 8644) of L-type Ca^{2+} channels showed that these types of channels are present in the corticostriatal terminals, but far from the active zone of the synapse. Probably, the L-type of Ca^{2+} channels may contribute to the depolarization after the upset of the action potential.

The activation of the muscarinic and the GABAergic receptors produce a presynaptic inhibition in the corticostriatal synapses. In both cases this presynaptic modulation is due to a decrease in the entry of the external Ca^{2+} . Experiments with pharmacological occlusion revealed that the actions of both muscarine and baclofen were completely occluded when Q-type Ca^{2+} channels had been blocked.

In conclusion, the corticostriatal synapses have L-, N- and Q-type Ca^{2+} channels. The N- and Q-type Ca^{2+} channels are very close to the active zone of the synapse, whereas L-type Ca^{2+} channels are within the terminals but far from the active zone. However, only the Q-type Ca^{2+} channels are susceptible to be modulated by the action of cholinergic (by muscarinic receptors) and GABAergic agonists (by GABA_B receptors). Other mechanisms may also be involved in the presynaptic modulation of the corticostriatal synapses.

Introducción

1 Consideraciones Iniciales

La Sinapsis

El mecanismo por el cual la información es transferida de una neurona a otra es la transmisión sináptica^[93], la cual ocurre en sitios especializados denominados sinapsis, siendo el principal sitio de comunicación entre las neuronas^[88]. A través de las sinapsis se establecen microcircuitos neuronales y redes. Existen sinapsis eléctricas o químicas de acuerdo al mecanismo de transmisión. En la sinapsis eléctrica el cambio en el potencial de membrana es conducido a la otra célula por una vía de baja resistencia denominada unión estrecha o unión comunicante, formada por conexinas. Se trata de un tipo de transmisión rápida y frecuentemente bidireccional^[172]. Mientras que las sinapsis químicas utilizan una sustancia transmisora con que la neurona presi-

náptica se comunica con la postsináptica.

La figura 1 ilustra una sinapsis química típica del sistema nervioso central. En ella podemos distinguir dos componentes. Uno presináptico y otro postsináptico, el primero de ellos es el elemento terminal de los axones y la salida de la señal eléctrica que envía la neurona efectora conocida como terminal nerviosa o botón sináptico. En esta zona el axón se ensancha y su membrana forma el componente presináptico y se adosa estrechamente a la membrana de otra neurona también especializada formando el componente postsináptico. Este tipo de sinapsis utiliza una sustancia transmisora con que la neurona presináptica se comunica con la postsináptica, la cual es sintetizada por

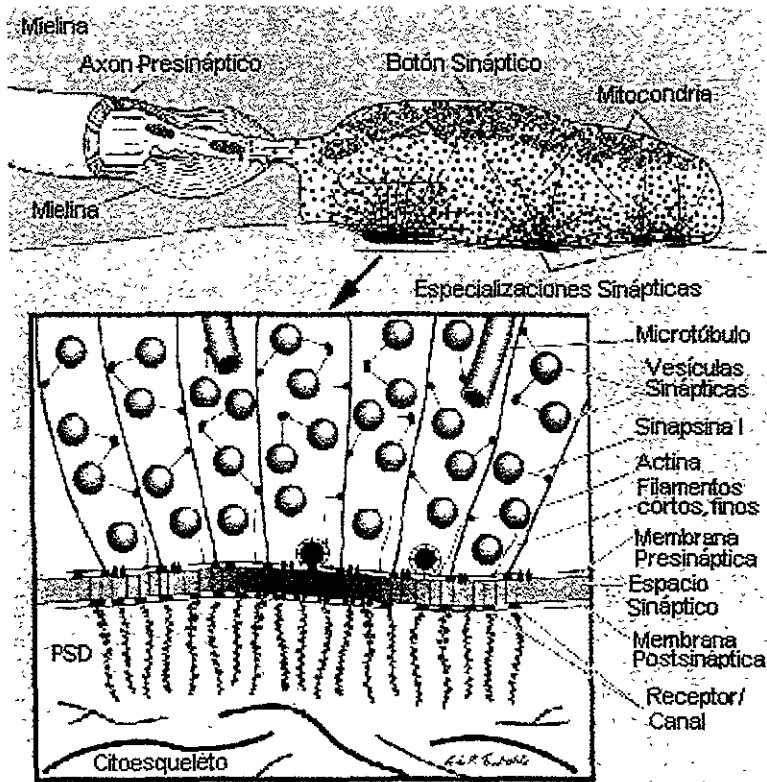


Figura 1. La Terminal Sináptica. La figura muestra un botón sináptico que contiene cuatro especializaciones separadas. El inserto muestra una ampliación de una de esas especializaciones. Se observa una red filamentosa de fibras parecidas a la actina que se extiende hacia el botón desde la membrana presináptica. Se observan también filamentos finos (probablemente de fodrina) unidos a la membrana presináptica. Racimos de vesículas sinápticas están unidas al citoesqueleto por sinapsina I. Aunque algunas vesículas cercanas a la membrana presináptica parecen estar despegadas, y son más móviles. Existe una subpoblación de vesículas específicamente ancladas en la membrana presináptica, listas para liberar su contenido, al arribo de un impulso nervioso. La liberación de neurotransmisor es disparado por la entrada de calcio a través de canales que se concentran en el sitio de liberación. El transmisor liberado se difunde a través del espacio sináptico, y finalmente se une a receptores localizados en la membrana postsináptica. Esto resulta en un flujo de corriente a través de la membrana postsináptica. La región conocida como densidad postsináptica (PSD) contiene una gran cantidad de receptores postsinápticos, y una alta densidad de proteínas (mostradas en el esquema unidas a los receptores). Entre ellas se incluyen kinasas y otras proteínas que pueden estar involucradas en la regulación de los receptores o en las propiedades de los canales. (Modificado de 193)

la neurona presináptica, almacenada en vesículas sinápticas y liberada al espacio extracelular [83, 92]. En condiciones de reposo la probabilidad de liberar una vesícula es muy baja, sin embargo no es nula [212, 40]. La probabilidad de liberación se incrementa poderosamente cuando la terminal nerviosa es depolarizada [40]. Se trata de una exocitosis regulada por sensores del cambio en la concentración interna de Ca^{2+} [193, 68, 212, 88, 92].

La llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica, provoca un incremento en la permeabilidad al Ca^{2+} , lo que promueve la liberación por exocitosis del neurotransmisor contenido en las vesículas (Fig. 2). La liberación de neurotransmisor es producida por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de una gran cantidad de canales concentrados en cada sitio de liberación [24, 25]. Esta sustancia reacciona con

receptores específicos de la célula postsináptica, que a su vez generan corrientes sinápticas que provocan cambios en el potencial de membrana de la célula postsináptica,

debido a la apertura de canales dependientes de voltaje subumbrales en la postsinapsis (Fig. 2). Si el cambio en el potencial de la célula postsináptica es suficiente para sobrepasar el potencial umbral de disparo de la célula postsináptica, entonces se inicia un potencial de acción postsináptico (Fig. 2) [88, 92].

La liberación de neurotransmisor ocurre en sitios especializados de la membrana presináptica. En estos sitios se han observado redes de filamentos que se extienden a los botones sinápticos desde la membrana presináptica (Fig. 1), este citoesqueleto no parece estar constituido por filamentos de actina ni microtubulos [111]. Los racimos de vesículas en los sitios

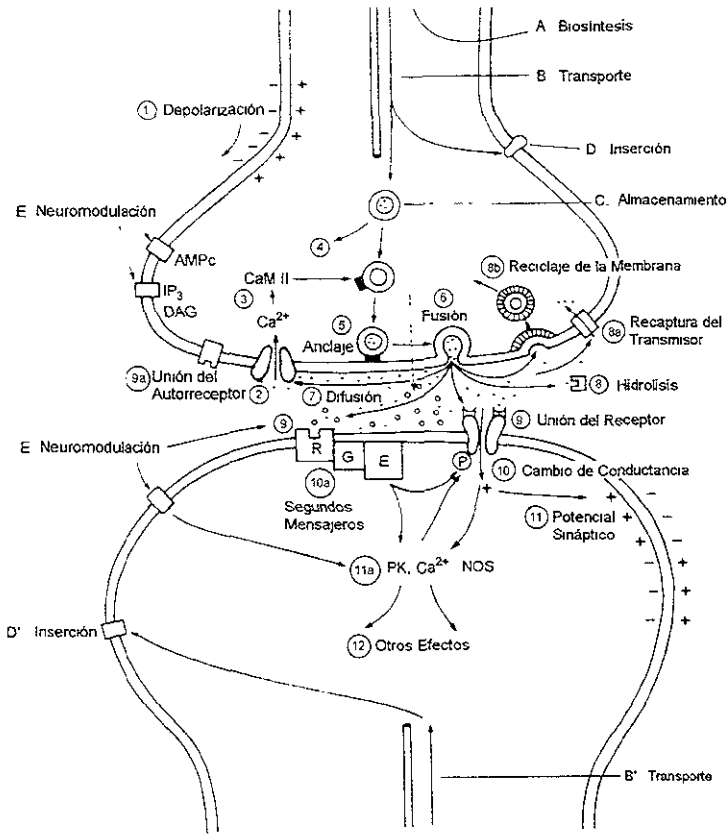


Figura 2. Mecanismo de Acción de la Sinapsis. (1) depolarización de la membrana sináptica; (2) entrada de calcio a la terminal; (3-5) movilización y fusión de la vesícula a su sitio de anclaje; (6) liberación de un paquete (cuanto) de moléculas de neurotransmisor; (7) difusión de las moléculas de neurotransmisor al espacio sináptico; (9) unión de las moléculas de neurotransmisor a los receptores en la membrana de la célula postsináptica; (8) o bien, su degradación por diversas enzimas. (10) El neurotransmisor se puede unir a receptores ionotrópicos activando directamente conductancias en la célula postsináptica; (10a) asimismo el neurotransmisor se puede unir a receptores metabotrópicos, lo que involucra la activación de proteínas-G, (11a, 12) activando diversas vías de señalización. (11) la activación de receptores produce cambios en el potencial de la membrana. Abreviaturas: IP3, trifosfato de inositol; CaM II, calcio camodulin quinasa II; DAG, diacil glicerol. PK proteína quinasa, R, receptor; G, proteína-G, E, Enzima efectora; NOS, sintetasa del oxido nítrico [Modificado de 171]

de liberación se encuentran unidos a esta red de filamentos por sinapsina I, aunque algunas de estas vesículas parecen estar libres siendo más móviles. Existe una subpoblación de vesículas ancladas en lugares específicos ^[193], de tal modo que están listas para liberar su contenido al espacio sináptico cuando esto sea requerido

Las vesículas están ancladas en los sitios de liberación; aunque el anclaje, exocitosis y reciclaje de las vesículas después de la liberación no ha sido comprendido en su cabalidad, muchas proteínas potencialmente importantes ya han sido identificadas ^[193]. Una vez ancladas, sin embargo, las vesículas están preparadas y responden con exocitosis rápida a estímulos apropiados (normalmente a un incremento altamente localizado en el influjo de Ca^{2+}). El proceso de preparación involucra la formación de complejos multiproteicos que atan la vesícula se-

cretora a la membrana plasmática en estrecha yuxtaposición con otros importantes elementos de señalización. Estos complejos involucran proteínas de las membranas de las vesículas secretoras y de la membrana plasmática neuronal, así como otros elementos que ayudan a unirlos entre sí. Algunas de las proteínas también tienen propiedades que les permiten responder a la señal de Ca^{2+} que dispara la exocitosis

En la zona activa (Fig 3) se forman complejos proteicos entre proteínas SNAP con proteínas NSF (por sus siglas en inglés: SNAP, soluble NSF-attachment protein; NSF. NEM-sensitive fusion protein), estas se unen a proteínas muy selectivas de la membrana denominadas SNAREs (soluble NSF-attachment protein receptors). En la vesícula la proteína SNARE se denomina sinaptobrevina o VAMP (vesicle associated membrane protein), mientras que en la membrana plasmática la proteína

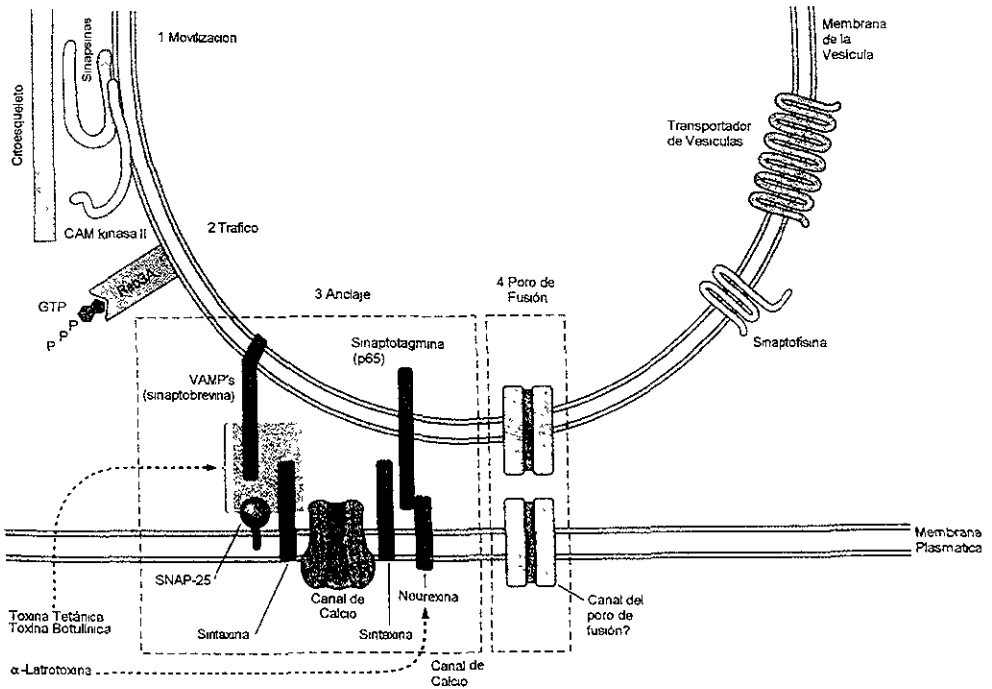


Figura 3. La Transmisión Sináptica. El diagrama muestra las proteínas de una vesícula sináptica y algunos de los receptores propuestos. Se asumen compartimentos separados para (1) almacenamiento, donde las vesículas se almacenan unidas al citoesqueleto. (2) tráfico, desplazamiento de las vesículas hacia los sitios activos. (3) Anclaje de las vesículas en las zonas activas y su preparación para la liberación. (4) formación del poro de fusión y liberación. Algunas de esas proteínas son blancos de neurotoxinas que actúan modificando la liberación de neurotransmisor. VAMP (sinaptobrevina), SNAP-25 y sintaxina son bloqueadas por toxinas botulínicas, la α -latrotoxina que se une a neurexinas produciendo la depleción de las vesículas secretoras [Modificado de 92].

SNARE es la syntaxina [69; 68; 212]. El complejo inicial formado entre la proteína de la membrana plasmática syntaxina IA, la SNAP-25 y la proteína vesicular sinaptobrevina, con una estequiometría de 1:1:1, proporciona un andamiaje de alta afinidad de receptor para la proteína α -SNAP, y su arribo permite el reclutamiento de NSF. Un aspecto que vale la pena resaltar es el hecho de que aunque las vesículas estén ancladas y fusionadas a la membrana, gracias a estos complejos proteicos, no son capaces de liberar su contenido al espacio sináptico ya que esto depende de que la concentración intracelular de Ca^{2+} alcance valores micromolares. Al parecer la hidrólisis de ATP, junto con la disociación de NSF/ α -SNAP causa la fusión parcial de la vesícula con la membrana plasmática, alistándola para la liberación final.

La apertura de los canales de Ca^{2+} proporciona la señal para la exocitosis. Uno de los candidatos para funcionar como sensor de Ca^{2+} es otra proteína de la vesícula sináptica denominada sinaptotagmina, que se une al complejo VAMP-syntaxina (Fig. 3). Al parecer, la syntaxina está asociada a canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q [190]. Otra proteína vesicular, la sinaptofisina participa en la formación de un poro de fusión que promueve la liberación por exocitosis del neurotransmisor contenido en las vesículas (Fig.3) [68 212, 92].

El ion Ca^{2+} en la terminal sináptica juega un papel fundamental en el control de la liberación del neurotransmisor; actuando sobre diferentes estructuras de la maquinaria de liberación. El proceso de liberación depende de la acumulación de transmisor en el interior de las vesículas. En el reposo, las vesículas cargadas de neurotransmisor se localizan ya sea en el citoplasma, uni-

das a filamentos, o ancladas en la zona activa de la membrana presináptica. Ésta se caracteriza por la gran densidad de canales de Ca^{2+} y los complejos proteicos que permiten el anclaje de las vesículas. En el lado postsináptico se encuentra una alta densidad de receptores [7, 68, 212].

El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) genera diferentes respuestas en la terminal, ya que este ión actúa como segundo mensajero activando diversas vías de señalización intracelular. De tal modo que las variaciones espaciales y temporales en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permiten regular diversas funciones dentro de la terminal. Asimismo existe una variación substancial en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en diferentes partes de la neurona así como una distribución heterogénea de canales de Ca^{2+} [19]. En las vesículas sinápticas las sinapsinas son fosforiladas por proteínas del tipo de la Ca^{2+} -Calmodulin-

Kinasa I, que en su forma defosforilada se encargan de mantener a las vesículas unidas al citoesqueleto. Mientras que la depolarización de la terminal favorece la fosforilación de la sinapsina I, por un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que trae como consecuencia que la vesícula se separe del citoesqueleto para dirigirse al sitio de anclaje.

Por otro lado se conoce de la existencia de receptores a neurotransmisores en las mismas terminales de la célula presináptica. Son responsables de la regulación de la liberación de transmisor (auto- y heterorreceptores), ejercen su influencia sobre determinadas vías nerviosas [26, 185, 186]. Este último aspecto resulta de particular interés pues posibilita que algunas de las muchas aferencias que llegan a un núcleo, se vean favorecidas por su selectividad a un neurotransmisor en sus terminales. De tal modo que los diferentes neurotransmisores podrían estar generando

cambios en la circuitería neuronal de forma dinámica, por los efectos que ejercen en la presinapsis. Esto es, el sistema tendría un mecanismo para seleccionar que vías aferentes son activadas en un momento dado [58].

Los Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) han sido clasificados de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en cinco grupos esenciales denominados T, L, N, P/Q y R. Los canales T son activados a bajo voltaje (LVA) (< -50 mV); los canales restantes requieren mayores voltajes de activación (HVA) [30]. En la figura 4 se muestra un esquema de los VDCC, como se puede apreciar se trata de complejos proteicos heteroméricos compuestos de una subunidad α_1 (170-240 kDa) formadora del poro,

consistente de cuatro regiones transmembranales homologas. Cada región está formada por seis dominios transmembranales unidos por lazos citoplasmáticos de longitud variable y con el dominio del amino y el carboxilo terminal citoplasmáticos. La subunidad reguladora β (52-78 kDa) es enteramente citoplasmática [30]. Existe además una subunidad $\alpha_2\delta$ (140-170 kDa), que está formada por dos proteínas unidas entre sí por puentes disulfuro [190], siendo codificadas por el mismo gene. Esta subunidad está anclada a la membrana con dominios extracelulares altamente glucosilados, asimismo se ha reportado la existencia de otra subunidad γ (32 kDa) en los canales L de las células musculares exclusivamente [48].

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje han sido clasificados de acuerdo a sus

propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en cinco grupos esenciales denominados T, L, N, P/Q, y R (Tabla 1). Las proteínas de los diversos canales codificados por cDNA han sido secuenciadas y funcionalmente expresadas en sistemas celulares heterólogos [131, 166]. Los canales T son activados con voltajes bajos (<-50 mV). Los canales restantes requieren mayores voltajes de activación. Típicamente los canales N y P/Q se colocan junto a las series de vesículas ancladas en la sinapsis donde ellos controlan la exocitosis, demostrado por la sensibilidad de varios tipos de neurotransmisores a bloqueadores específicos de esos canales [206, 208 210 135]. Los canales R han sido los menos caracterizados debido a su insensibilidad a bloqueo farmacológico. Los canales más abundantes son los canales L, particularmente en las células

musculares tanto esqueléticas como cardíacas donde juegan un papel esencial en el mecanismo de acople excitación - contracción.

De forma similar a otros canales iónicos, el segmento S₄ de la subunidad α_1 de los canales de Ca²⁺ está asociado al sensor de voltaje. Esta altamente conservado en los diversos tipos de canales de calcio. Se piensa que este segmento se desplaza hacia el exterior cuando es depolarizado permitiendo la apertura conformacional del poro [30]. En la región del poro, existen cuatro residuos de glutamato cargados negativamente, que podrían explicar la alta selectividad al Ca²⁺ de estos canales [30].

Aunque la subunidad α_1 constituye por si misma el poro a través del cual el Ca²⁺ fluye hacia el interior de la célula cuando ésta es depolarizada, las subunidades β y $\alpha_2\delta$ presentan

Tabla 1
Canales de Calcio Dependientes de Voltaje

Propiedades y Farmacología	Canal T	Canal L	Canal N	Canal P	Canal Q	Canal R
Umbral de Activación (mV)	-70	-40 a -20	-30	-40	-40	?
Umbral de Inactivación (mV)	-110 a -50	-60 a -10	-120 a -30	?	-110 a -40	-120 a -30
Conductancia del canal (pS)	7 - 10	11 - 25	10 - 22	14	9 - 19	20
Tiempo de Apertura (ms)	0.5 - 2	0.5 - 1	0.7 a 1.5	< 1	?	?
Agonistas						
Bay K 8644		Si				
Antagonistas						
Kurtoxina	Si					
Dihidropiridinas		Kd <37 nM				
ω -CgTx GVIA			1 μ M			
ω -CgTx MVIIC			Kd = 1-10 μ M	Kd < 1 M	Kd > 5 μ M	
ω -AgTx IVA				< 20 nM	> 100 nM	
ω -AgTx TK				< 30nM	>200 nM	
SNX						Si
Ca^{2+}	Kd 40 μ M	Kd 1.5 μ M	Kd 1 μ M	?	Kd 1 μ M	?
Ni^{2+}	KD <40 μ M					
Subunidad α	$\alpha_{1T}, \alpha_{1G}, \alpha_{1H}$	$\alpha_{1S}, \alpha_{1D}, \alpha_{1C}$	α_{1B}	α_{1A}	α_{1A}	α_{1R}

Propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los canales de calcio [30, 216, 217, 134,218, 219, 220, 221]

importantes funciones regulatorias [17, 48, 190] Las subunidades β (Fig 4), al igual que la subunidad α_1 , están codificadas por varios genes (β_1, β_4), los cuales presentan múltiples variaciones [17-190],

que contribuyen a la diversidad molecular y funcional de los canales de Ca^{2+} neuronales. Los parámetros cinéticos (activación e inactivación) asociados con las corrientes de Ca^{2+} a

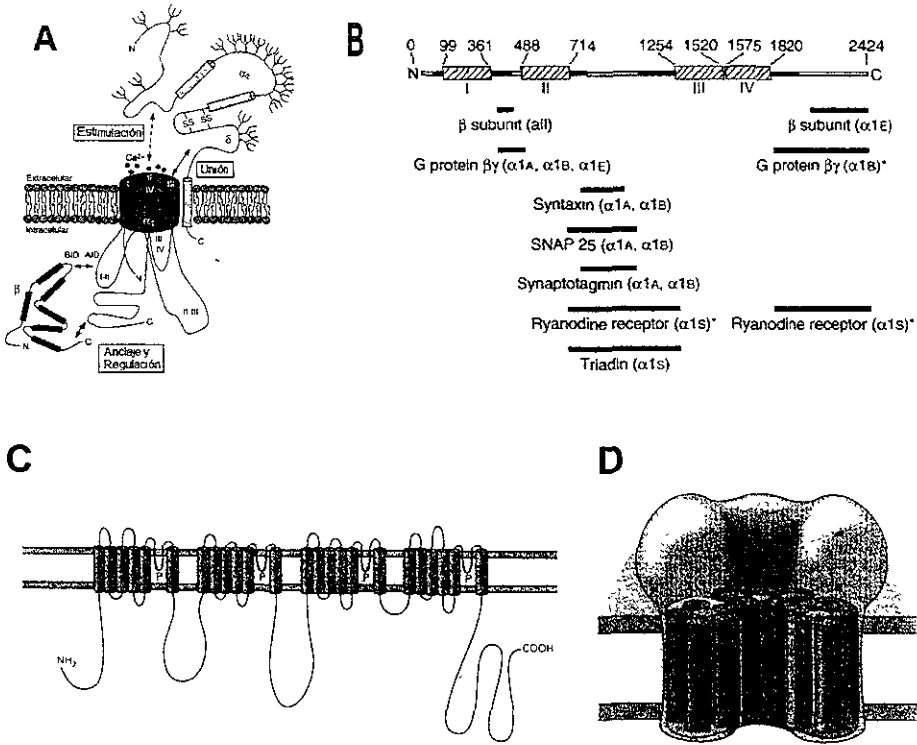


Figura 4. Organización estructural de los canales de calcio. (A) Se muestra la disposición de las subunidades de los canales de calcio, siendo similar en todos los tipos estudiados. Las asas citoplasmáticas están marcadas de acuerdo a los dominios que ellas enlazan. La subunidad β es enteramente citoplasmática, mientras que la subunidad $\alpha_2\delta$ es principalmente extracelular. Los sitios de interacción entre las subunidades están señalados por flechas. (B) la subunidad α_1 interactúa con diversas proteína citoplasmáticas, muchas de ellas involucradas en la liberación de neurotransmisores. Los dominios transmembranales I-IV se muestran como diagramas de caja, cada uno de ellos compuesto de seis segmentos transmembranales. Las barras negras indican los sitios de interacción con las proteínas indicadas. (C) los canales de calcio están formados por una cadena α polipeptídica que contiene cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6), de los cuales S4 es el sensor de voltaje. Además entre S5 y S6 se encuentra la región formadora del poro (P), tal como se aprecia en D. [A y B tomados de 190; C y D tomado de 92].

través de subunidades α_1 son afectadas por la coexpresión de varias isoformas de subunidades β en ovocitos de *Xenopus sp*. Las subunidades β llevan los sitios de fosforilación para diversas proteínas cinasas [17, 190]. Algunos de estos canales, particularmente aquellos involucrados en la liberación de neurotransmisores son susceptibles de ser modulados por reacciones de fosforilación y defosforilación llevados a cabo por diferentes proteínas-G.

La actividad de canales de Ca^{2+} N y P/Q puede ser inhibida reversiblemente después de la activación de proteínas-G acopladas a receptores a través de vías restringidas a membrana. La reducción en la actividad del canal resulta en una reducción en la amplitud del pico de corriente y un enlentecimiento en la cinética de activación. Este tipo de

interacción directa ha sido demostrada entre complejos $\beta\gamma$ de proteínas-G y algunas secuencias de asas citoplasmáticas entre los dominios transmembranales I y II (Fig. 3C). Uno de los cuales se sobrepone al dominio de interacción de la subunidad β , sugiriendo un antagonismo funcional entre las subunidades β y las proteínas-G. Por otro lado en estos mismos canales se ha demostrado una situación similar para la interacción con componentes de la maquinaria excitotónica de liberación de neurotransmisores [17, 190].

La liberación de neurotransmisor de vesículas sinápticas es inducida por el influjo de Ca^{2+} en los VDCC, y la rapidez de esta respuesta recae en la estrecha proximidad de los sitios en los cuales la exocitosis ocurre y los sitios de influjo de Ca^{2+} . La base de esta estrecha proximidad ha venido siendo

más clara con la identificación de sitios de interacción directa del asa entre los dominios transmembranales II y III de las subunidades α_{1A} y α_{1B} con algunas proteínas que intervienen en la liberación, tanto membranales como la syntaxina y el SNAP-25, así como otras vesiculares, como VAMP y sinaptotagmina. Esto sugiere el papel del influjo de Ca^{2+} en la respuesta vesicular. Además, interacciones entre proteínas SNARE y VDCC también parecen jugar un papel en la modulación de la actividad del canal. En ese sentido se ha reportado que los canales tipo N son regulados por proteínas-G sólo cuando están asociados a syntaxina, indicando el mecanismo para el control selectivo de los canales asociados a sitios de liberación [17, 190].

El papel del Ca^{2+} en la Liberación

En condiciones de reposo la concentración intracelular de Ca^{2+} no es mayor de 10^{-7} o 10^{-8} M, que es al menos 10,000 veces menor que la concentración de Ca^{2+} extracelular [68, 155]. Esta diferencia de concentraciones es mantenida en la terminal por varios mecanismos. La difusión de Ca^{2+} está severamente limitada por amortiguadores de Ca^{2+} , ya que tan pronto entra es capturado por proteínas como calmodulina, parvalbumina o calbindina. También es secuestrado por organelos intracelulares, como las mitocondrias y retículo endoplásmico liso con alta afinidad. Del mismo modo las vesículas sinápticas capturan Ca^{2+} , pero con menor afinidad. Finalmente es expulsado al espacio extracelular por intercambiadores Na^+ - Ca^{2+} y por bombas metabólicas [19].

La depolarización producida por la llegada de un potencial de acción a la

terminal presináptica, provoca un cambio en la concentración interna de Ca^{2+} . Ya sea por la entrada de Ca^{2+} extracelular debida a la activación de los VDCC [199, 200] o por la liberación de Ca^{2+} de sitios de almacenamiento intracelulares [129]. Cuando se bloquean los canales de Ca^{2+} membranales con Cd^{2+} o Co^{2+} , o bien cuando se elimina el Ca^{2+} del medio extracelular, el potencial postsináptico desaparece, a pesar de que los potenciales que alcanzan la terminal sináptica permanecen inalterados. Por lo que la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de VDCC es necesaria para producir la exocitosis de neurotransmisor [68, 212].

Cuando las terminales nerviosas son depolarizadas se puede observar la aparición de microdominios de Ca^{2+} que alcanzan de 200 a 300 μM de concentración [30, 165, 144]. Estos microdominios se encuentran en la zona activa de la membrana presináptica, es decir, en la

zona donde se encuentran vesículas ancladas y listas para liberar. En la sinapsis rápida, el Ca^{2+} que difunde en el citosol dentro de los primeros 200 μs que siguen a la llegada de un potencial de acción no sobrepasa los 10 nm de la boca del canal [30, 165, 144]. Por lo que la entrada de Ca^{2+} al elemento presináptico ocurre en estrecha proximidad con el aparato de liberación [68, 212, 30, 165, 144]. Por otro lado, el número de iones de Ca^{2+} que entran por unidad de tiempo depende de: a) el número de canales de Ca^{2+} abiertos, los cuales dependen de la actividad presináptica, b) el número de canales de Ca^{2+} susceptibles de activación y c) la presencia de canales de K^+ [68].

Se ha demostrado por mediciones de potenciales postsinápticos que la apertura de VDCC, la entrada de Ca^{2+} , la activación de la maquinaria excitotóxica, la liberación de neurotransmisor y su

difusión por el espacio sináptico hasta activar los receptores de la membrana postsináptica toma muy poco tiempo (200 - 300 μ s). Por lo que las vesículas sinápticas deben estar ancladas y listas para liberar muy cerca de los sitios de liberación, asimismo deben estar muy cerca o en contacto con canales de Ca^{2+} , [68, 212; 30 165]. Sin embargo no todos los canales de Ca^{2+} están asociados a la liberación de neurotransmisor, por ejemplo en la sinapsis cortico-estriatal los canales L y T no participan directamente o su participación no es significativa [11].

Debido al amplio rango de funciones que dependen de la activación de canales de Ca^{2+} , no resulta sorprendente la existencia de diversas toxinas naturales que inhiben selectivamente a estos canales tanto pre- como postsinápticamente. Así las toxinas extraídas de invertebrados depredadores combinadas con fármacos producidos sintéti-

camente, proporcionan una batería de sustancias que permiten discriminar entre diversos tipos de corrientes de Ca^{2+} que han sido definidas originalmente sobre la base de sus características biofísicas.

Las 1,4-dihidropiridinas (DHP) han sido utilizadas para identificar un tipo de canales de Ca^{2+} presente en todos los tipos de músculo, así como en neuronas y células endocrinas. Se trata de los canales de Ca^{2+} de tipo L. Estos canales expresan las subunidades α_{1S} , principalmente en músculo esquelético y liso, α_{1C} , en músculo cardíaco y liso y en cerebro, y α_{1D} , en riñón, células endocrinas y cerebro. En presencia de antagonistas de las DHP's, como nifedipina, nitrendipina o nicardipina estos canales permanecen menos tiempo en el estado abierto, mientras que agonistas como el metil - 1,4 - dihidro - 2,6 - dimetil - 3 - nitro - 4 - (trifluorometilfe-

nil) – piridina – 5 - carboxilato (BayK-8644) promueven el estado activado que se caracteriza por permanecer abierto.

Entre las toxinas de origen natural se ha descrito que las ω -conotoxinas bloquean conductancias de Ca^{2+} de tipo no-L. Se trata de toxinas extraídas de caracoles marinos depredadores de la familia Conidae, una de ellas se extrae de *Conus geographus*: La ω -Conotoxina-GVIA (ω -CgTx-GVIA). Esta toxina bloquea corrientes de Ca^{2+} insensibles a las DHP's en neuronas pero no en músculo. Los canales sensibles a esta toxina se denominan canales de Ca^{2+} de tipo N. Expresan la subunidad α_{1B} , en células endocrinas y neuronas.

Otra toxina, extraída de *Conus magus*, la ω -Conotoxina MVIIIC (ω -CgTx MVIIIC), además de bloquear los canales de Ca^{2+} tipo N, bloquea otra conductancia de Ca^{2+} resistente a las DHP's y a la ω -

CgTx-GVIA, descrita originalmente en células de Purkinje en el cerebelo, denominada conductancia de tipo P. Esta conductancia es particularmente sensible a bajas concentraciones de toxinas extraídas de la araña *Agelenopsis aperta*, ω -Agatoxina IVA (ω -AgTx-IVA) y ω -Agatoxina TK (o IVB) (ω -AgTx-TK). Estos canales expresan la subunidad α_{1A} . También se ha reportado la conductancia tipo Q insensible a las DHP's y a la ω -CgTx-GVIA. Es sensible a la ω -AgTx-IVA y ω -AgTx-IVB, pero con menor afinidad que los canales tipo P, por lo que se requieren concentraciones mayores de estas toxinas para bloquearla. También expresa la subunidad α_{1A} , siendo la diferencia entre los canales P y Q unos cuantos aminoácidos, por lo que frecuentemente se reporta como la conductancia P/Q [21]. Finalmente se ha reportado que hay otra conductancia de Ca^{2+} resistente a todas las toxinas antes

mencionadas, denominada conductancia tipo R, expresado por las subunidad α_{1E} . Sin embargo es claramente distinguible de la conductancia T, porque se activa a potenciales superiores a -50 mV, sus corrientes se desactivan con constantes de tiempo de cientos de microsegundos^[59].

II Consideraciones Funcionales

La neuromodulación

La actividad eléctrica y la capacidad de respuesta de una neurona dependen de sus propiedades eléctricas intrínsecas y de las señales extrínsecas provenientes de las sinapsis y ambiente químico que las rodea. Las propiedades intrínsecas provienen del arreglo de canales dependientes de voltaje y dependientes de ligando presentes en la neurona, así como la propia geometría neuronal; que tomadas en conjunto, condiciona el rango de comportamiento eléc-

Existen además otras conductancias de Ca^{2+} , denominadas de bajo umbral, caracterizados por los canales de Ca^{2+} tipo T, expresados por las subunidades α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} , que al parecer, no se observan en las terminales nerviosas.

trico disponible para responder a señales extrínsecas. Por otro lado, las señales extrínsecas del tipo de los neurotransmisores y las hormonas, ejercen su efecto por la apertura o cierre de canales iónicos en las neuronas blanco. Los canales iónicos pueden ser substratos para la fosforilación por diferentes cinasas, defosforilación por diferentes fosfatasas, interacción con el ácido araquidónico y sus metabolitos, así como interacción directa con proteínas-G. Esas

señales modulatorias pueden no ser suficientes por si mismas para producir el disparo en las terminales sinápticas, sin embargo, producen dramáticos efectos que afectan profundamente el funcionamiento de los canales, y por lo tanto de la neurona [115].

Entre las vías modulatorias mediadas por proteínas-G, aquellas que involucran canales de Ca^{2+} tienen un impacto amplio sobre la fisiología de la neurona, ya que la entrada de Ca^{2+} además de contribuir a la liberación de neurotransmisores evoca diversas respuestas celulares tales como la apertura de canales de potasio dependientes de Ca^{2+} , propagación del impulso nervioso, reacciones enzimáticas y transcripción de genes. Modificaciones a corto y largo plazo de respuestas neuronales o transmisión sináptica resultan de la modulación de los canales de Ca^{2+} [115]. Sin embargo, la comprensión de los mecanismos de neuromodulación mediada

por canales de Ca^{2+} requiere de la identificación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que están presentes en las neuronas, y que están involucrados en las conocidas respuestas modulatorias producidas por la activación de receptores presinápticos [115].

Papel de las Proteínas-G en la modulación

La activación de receptores acoplados a proteínas-G inicia cuando el ligando se une al típico receptor de siete dominios transmembranales. Esto produce un cambio conformacional que lleva a un decremento en la afinidad de la subunidad $G\alpha$ por GDP, disociándola de este y reemplazándolo por GTP. Una vez que el GTP esta asociado a la subunidad $G\alpha$, ésta asume su conformación activada y se disocia del dímero $G\beta\gamma$. El estado activado persiste hasta que el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la sub-

unidad $G\alpha$; cuando esto sucede la subunidad $G\alpha$ se reasocia con el dímero $G\beta\gamma$ para formar el heterotrímero inactivo [67, 78].

La modulación de la actividad de los canales iónicos dependiente de Proteínas-G actúa de forma relativamente lenta (100 ms – 1 s) en comparación con las aperturas de canales dependientes de ligando producidas por la acción de sus agonistas, sin embargo, es mucho más rápida que las cascadas regulatorias dependientes de fosforilación [78].

Existen evidencias del efecto directo de la activación de proteínas-G sobre los canales iónicos [78, 149] en fenómenos que parecen estar confinados a la membrana e independientes de eventos citosólicos. Por otro lado, la activación de proteínas-G puede actuar sobre diferentes vías de señalización que finalmente pueden fosforilar a los

canales iónicos, modulando de este modo la entrada de iones desde el exterior de la terminal, como se aprecia en la figura 5 [149].

La modulación presináptica

La cantidad de transmisor liberado al espacio sináptico, la disponibilidad con la cual éste es liberado, y la respuesta de la célula postsináptica al transmisor, contribuyen a la efectividad de la conexión sináptica. La terminal sináptica es un sitio de regulación de los cambios dependientes de la actividad en la función sináptica. La liberación de neurotransmisor de las terminales presinápticas es modulada por una variedad de mecanismos. La modulación es importante para numerosas funciones nerviosas tales como: reflejos espinales, activación sensorial, aprendizaje y memoria, entre otros. Asimismo esos mecanismos modulatorios son sitios de

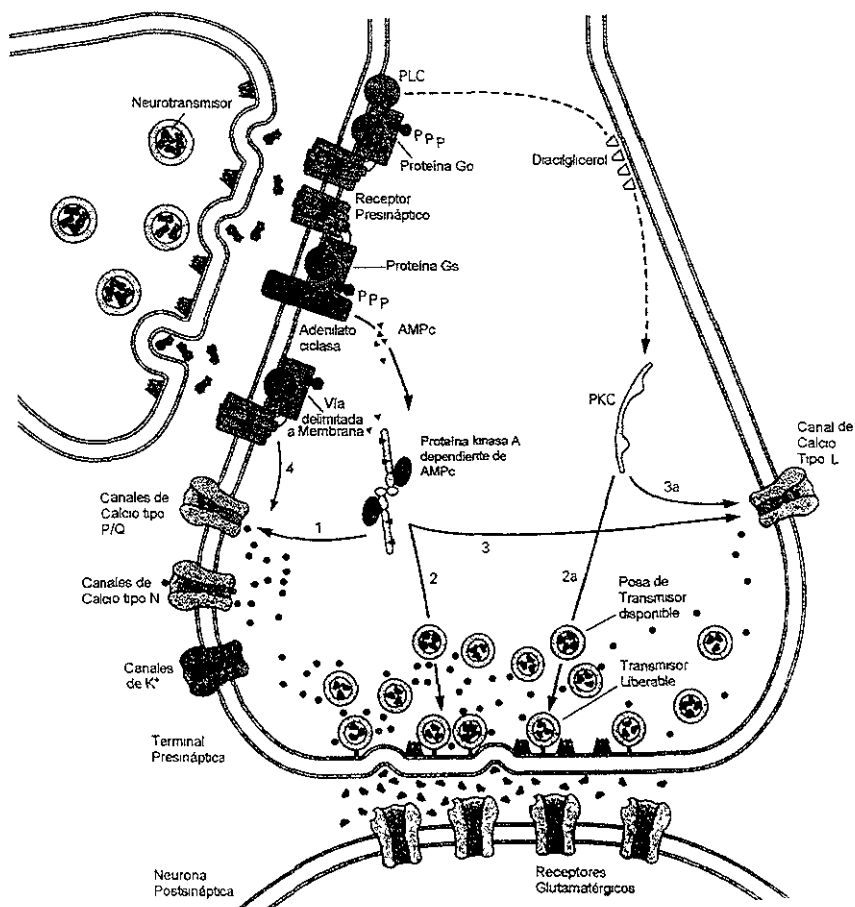


Figura 5. Modulación Presináptica. Cuando los receptores son ocupados por su agonista, permiten la activación de proteínas-G. Algunas de ellas incrementan la actividad de la adenilato ciclasa (G_s). La adenilato ciclasa convierte ATP en AMPc. Éste activa la proteína quinasa A, dependiente de AMPc (PKA). La actividad catalítica de la PKA puede actuar (1) decrecientando corrientes de K^+ , lo que prolonga la depolarización, permitiendo una mayor entrada de calcio. (2) directamente sobre las vesículas, movilizándolas hacia la zona activa, haciendo más efectiva la liberación. (3) Actuando a través de canales de calcio. Del mismo modo la activación de receptores metabotrópicos puede actuar en proteínas G_o , que activan la fosfolipasa C (PLC), la cual a su vez estimula al diacil glicerol, que activa a la proteína quinasa C (PKC) (3a, 2a). Por otro lado se ha reportado que la subunidad $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas-G puede tener actividad catalítica directamente sobre los canales de calcio en una vía delimitada a membrana (4). [Modificado de 92]

numerosas enfermedades de carácter hereditario o adquiridas.

En términos generales, pueden existir dos tipos de receptores presinápticos: aquellos que se constituyen como receptor canal, es decir receptores ionotrópicos, o aquellos en los que el receptor es una estructura independiente y está acoplado a los canales por proteínas-G, conocidos como receptores metabotrópicos [68].

En el caso de los receptores ionotrópicos, existen diversos mecanismos que pueden alterar la liberación de neurotransmisor. En el caso de inhibición presináptica la activación de canales permeables a Cl^- , como el receptor GABA_A , deben incrementar la conductancia al Cl^- , lo que produce un cambio en la conductancia de la membrana en el reposo. Debido a esto se impide el flujo de la corriente excitatoria, por lo que se puede inhibir el potencial de acción que invade la terminal presináptica,

o bien reduciendo la amplitud del potencial de acción que se propaga a la terminal [119]. La activación de receptores ionotrópicos catiónicos, debe depolarizar las terminales presinápticas, lo que produce un aumento en la liberación. Una inhibición puede producirse si la depolarización es subumbral e inactiva los canales dependientes de voltaje de Na^+ y/o Ca^{2+} . Un aumento en la liberación debe producirse por un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que produce un influjo directo de Ca^{2+} a través de los receptores ionotrópicos o a través de la apertura de VDCC debido a la depolarización inducida por el transmisor. Un incremento en los niveles de Ca^{2+} , puede directamente activar la maquinaria de liberación o activar las vías modulatorias, como las que involucran a la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} calmodulina o a la fosfoproteína calcineurina fosfatasa. Esos efectos deben alterar el proceso de liberación a

través de reacciones de fosforilación-desfosforilación. Por otro lado, la elevación en los niveles de Ca^{2+} intracelular puede ser amplificada a través de la liberación de Ca^{2+} inducida en los compartimentos celulares que almacenan Ca^{2+} (retículo endoplásmico, mitocondrias, etc.). Tomando en cuenta esta gran diversidad de mecanismos, los cursos temporales de la modulación presináptica pueden ser muy variables.

La activación de receptores presinápticos por diversos neurotransmisores y neuromoduladores puede producir inhibición en la liberación de neurotransmisor. La inhibición presináptica puede servir como un medio de ajustar la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación de neurotransmisor. Evidencia previa muestra que los moduladores presinápticos inhiben a los canales de Ca^{2+} y activan canales de potasio en la terminal [210, 135].

Se piensa que la activación de receptores metabotrópicos en las terminales presinápticas modula la actividad de canales de Ca^{2+} y K^+ dependientes de voltaje, a través de la activación de segundos mensajeros y fosforilación proteica [113], o por efectos directos de la activación de proteínas-G [202]. La modulación de estos canales puede regular la liberación, controlando el aumento de la entrada Ca^{2+} en la terminal presináptica durante un potencial de acción [55, 206, 207, 211]. En el caso de receptores acoplados a proteínas-G, se han sugerido tres mecanismos principales: (a) la inhibición de los canales de Ca^{2+} en la terminal nerviosa, (b) la activación de canales de K^+ presinápticos, resultando una reducción en la efectividad del potencial de acción, y (c) modulación directa de uno o más componentes del aparato de liberación vesicular [135, 138].

La modulación presináptica de los canales de potasio consiste en acti-

var conductancias de K^+ , como los rectificadores entrantes u otros canales de K^+ , a través de receptores acoplados a proteínas-G [137, 36]. Al incrementar la conductancia del ion K^+ se disminuye la duración y amplitud del potencial de acción en la terminal sináptica. Por lo tanto, la depolarización en la terminal es menos efectiva, ya que los canales de Ca^{2+} permanecen menos tiempo abiertos y en consecuencia menor cantidad de neurotransmisor es liberado [63].

La modulación presináptica a través de canales de Ca^{2+} se ha establecido por la activación de receptores que se unen a proteínas-G, los cuales 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 con los dominios

I y II de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} (Fig. 3C) [73].

El papel de los canales de Ca^{2+} en la modulación de la liberación de neurotransmisores ha sido bien establecido utilizando toxinas peptídicas altamente específicas para los diferentes tipos de canal de Ca^{2+} , así como otras técnicas [206, 207, 208, 209; 210, 214, 215, 75; 95, 96, 97, 98].

III Los Ganglios Basales

Los ganglios basales desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones motoras, en particular en la planificación, iniciación y ejecución de los movimientos ^[10, 136, 64]. La mayor parte de nuestro conocimiento actual involucra a los ganglios basales con funciones motoras. Nos basamos en el estudio de desórdenes en humanos, en particular con patologías como las enfermedades de Parkinson y Huntington, así como modelos en animales que simulan estas enfermedades. Es generalmente aceptado que los ganglios basales están involucrados en una variedad de funciones no-motoras, que incluyen aquellas relacionadas a conductas incentivas y motivacionales ^[64, 184].

Estudios de las dos últimas décadas han llevado a la conclusión de que existen numerosas similitudes en la

organización de los ganglios basales de vertebrados amnióticos (reptiles, pájaros y mamíferos), lo que hace pensar en que esta organización ya estaba presente en los antepasados de este tipo de animales. Por el contrario, se ha señalado que deben existir diferencias mayores en la organización de los ganglios basales entre los amniotas y anamniotas actuales (peces y anfibios), sugiriendo que el buen desarrollo de los ganglios basales se llevó a cabo únicamente en la transición evolutiva de anamniotas a amniotas. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que características de la organización fundamental de los ganglios basales tal como observa en los organismos amnióticos, ya existe en el cerebro de los anfibios, cuyos antepasados dieron origen a vertebrados como los reptiles desde el periodo carbonífero ^[123]

En los mamíferos, los GB son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que se expanden a través del telencéfalo, diencefalo y cerebro medio. En un sentido estricto, el término de GB se refiere a los componentes estriatales y palidales de la porción basal del telencéfalo que se desarrolla de las eminencias gangliónicas lateral y media respectivamente. Este término incluye frecuentemente a la sustancia nigra (SN), el área ventral tegmental y al núcleo subtalámico por su estrecha relación anatómica y funcional con el cuerpo estriado y el pálido. En mamíferos, los GB se subdividen en dos componentes distintos que involucran tanto estructuras estriatales como palidales, que constituyen el sistema estriato-palidal dorsal y ventral [123, 163, 162]. El sistema estriato-palidal dorsal consiste en la porción dorsal del estriado, o estriado propiamente dicho (núcleos caudado y putamen en felinos y primates, caudado-putamen en otros

do-putamen en otros mamíferos), y el pálido dorsal. Este último se subdivide en dos partes con diferente conectividad y quimioarquitectura: Son el segmento externo del globo pálido (en primates), o sencillamente globo pálido (en no-primates), y el segmento interno del globo pálido (en primates) o núcleo entopeduncular (en no-primates) [150, 151]. El sistema ventral estriato-palidal está constituido por el estriado ventral (núcleo accumbens y parte del tubérculo olfatorio) y el pálido ventral [150, 151]. La naturaleza estriatal del núcleo accumbens y la porción de células medianas del tubérculo olfatorio ha sido establecida con base a su desarrollo, conexiones y quimioarquitectura. Mientras que el pálido ventral presenta características similares con el pálido dorsal [71, 133, 188].

El neostriado constituye la principal entrada a los GB, pues recibe numerosas aferencias glutamatérgicas de la corteza sensorial, motora y de aso-

ciación, asimismo recibe información de los núcleos intralaminares del tálamo (Figura 6). También recibe entradas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc) y entradas serotonérgicas del núcleo del Rafe dorsal así como entradas del núcleo basolateral de la amígdala para el núcleo accumbens [116]. Mediante el uso de anticuerpos contra péptidos marcadores químicos para las encefalinas o la sustancia-P [205], así como por la presencia de receptores a opiáceos de tipo μ [195, 194] se pudo de diferenciar entre los compartimentos estriosomal y matricial del neostriado, así como describir las principales vías eferentes denominadas: directa e indirecta, que constituyen la principal base de organización de los GB [177]. De este modo, se sabe que el neostriado proyecta casi exclusivamente hacia otras estructuras de los GB como el globo pálido (interno y externo) y la sustancia nigra pars reticulata

(SNr). De hecho casi la mitad de las neuronas espinosas medianas proyectan únicamente al segmento externo del globo pálido formando la vía indirecta. Los axones de estas neuronas coliberan encefalinas junto con ácido γ -amino butírico (GABA). Mientras que la otra mitad de las neuronas espinosas medianas que proyectan al globo pálido interno y a la nigra coliberan Sustancia-P, formando la vía directa [6, 140, 173, 205].

Las fibras aferentes que ingresan al neostriado provenientes de la corteza liberan glutamato [126], y producen un patrón anatómico descrito por Cajal como "dendrítico cruciforme" [Citado por 205]. Lo que significa que la fibra establece un curso relativamente recto a lo largo del tejido, cruzando sobre dendritas y dejando sinapsis *en passant*. Esto implica que cada fibra individual cruza los campos dendríticos de muchas neuronas, pero sólo establece sinapsis con algunas de ellas. Por lo que resulta muy

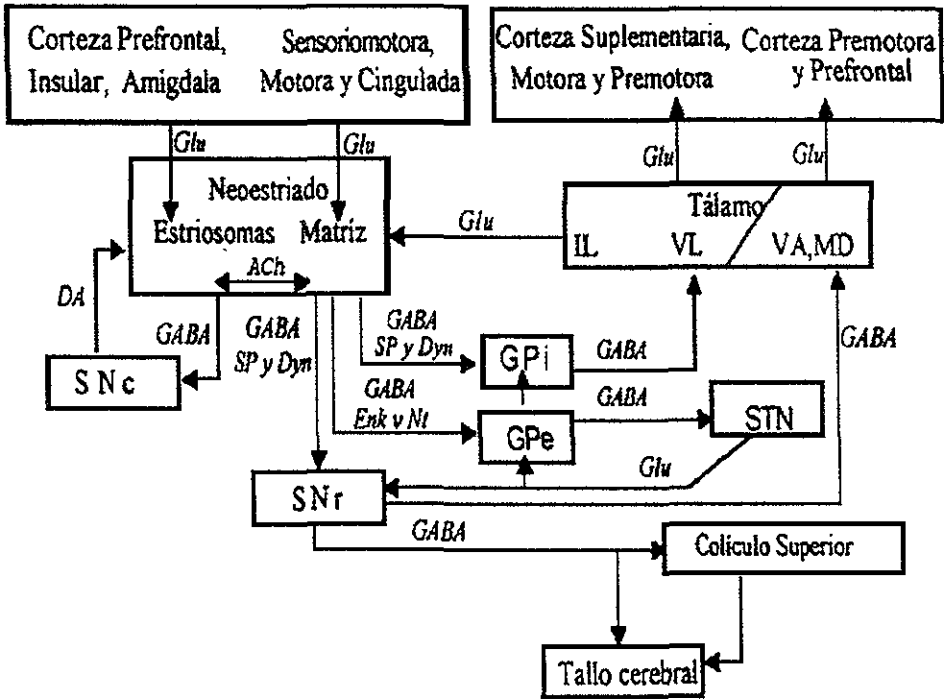


Figura 6. Principales aferentes y eferentes de los ganglios basales. En el diagrama se muestra la compartimentalización de la entrada cortical hacia el núcleo estriado, tal como se observa en los mamíferos actuales. Las neuronas de proyección de los estriosomas proyectan hacia la sustancia nigra pars compacta (SNc) y reciben aferentes de ella. Las neuronas espinosas medianas de la matriz proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulata (SNr) así como y al globo pálido interno (GPi) y externo (GPe). El GPi proyecta hacia el tálamo ventral lateral, y éste a su vez envía terminales a regiones motoras de la corteza. El GPe mantiene proyecciones recíprocas al núcleo subtálamo (STN), quien a su vez proyecta hacia la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior (VA) y dorsal medial (MD). Estos núcleos proyectan hacia las regiones límbicas de la corteza. En el diagrama se muestran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías: Acetilcolina (ACh), dopamina (DA), dinorfina (Dyn), encefalinas (Enk), glutamato (Glu), ácido γ -aminobutírico (GABA), neurotensina (Nt) y sustancia P (SP) ^[Tomado de 74]

importante comprender cuales son las áreas de la corteza que mandan axones a las diferentes áreas del neocóstriado [140, 173, 205], así como el tipo de conexiones que establecen y la forma en que son moduladas.

La mayor parte de las neuronas del neocóstriado son neuronas de proyección, es decir, sus axones salen de este núcleo y establecen sinapsis fuera de él. Estas neuronas reciben el nombre de espinosas medianas por el gran número de espinas dendríticas que presentan. Asimismo sintetizan y liberan GABA. Un grupo de estas neuronas proyecta al segmento externo del globo pálido formando la vía indirecta, mientras que las restantes proyectan hacia los segmentos externo e interno del globo pálido, así como a la sustancia nigra formando la vía directa [6, 116, 140, 173, 205].

Existen además otras estirpes neuronales cuyos axones se quedan en

el propio neocóstriado, estableciendo de ese modo los diversos tipos de interneuronas propias de este núcleo [10, 116, 140, 173, 205]. Sus características se han determinado por registros intracelulares, técnicas de tinción e identificación inmunocitoquímica basada en el contenido de neuromoduladores y neurotransmisores que poseen. Se han descrito:

- A) Interneuronas colinérgicas grandes que forman menos del 2 % del total de células del neocóstriado pero que exhiben grandes árboles dendríticos y ejercen una poderosa influencia sobre el disparo de las neuronas de proyección [205].
- B) Células en-canasta que contienen GABA y parvalbumina [107]. Son células no-espinosas que rodean a los somas de las neuronas espinosas medianas. Son cerca del 3 al 5 % del total de la población neuronal. Presentan disparo rápido y exhiben potenciales de acción de corta dura-

ción y un postpotencial hiperpolarizante pequeño; lo que permite el disparo sostenido a altas frecuencias y sin adaptación ^[101].

C) Células que además de GABA contienen somatostatina y óxido nítrico sintetasa. Representan menos del 2 % de la población neuronal ^[45, 181, 205]. Se trata de neuronas que presentan un disparo regular, pronunciada adaptación a la frecuencia de disparo y potenciales con depolarización sostenida ^[101].

Típicamente, las aferentes glutamatergicas que provienen de la corteza y del tálamo, establecen contactos sinápticos sobre la cabeza de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. Se trata de sinapsis asimétricas, mismas que se han asociado con sinapsis de tipo excitatorio ^[171]. Las células piramidales que originan las aferentes que llegan al estriado provienen, al menos en la rata y el mono, de las

capas V y VI ^[148, 163, 162]. Mientras que las colaterales de las neuronas espinosas medianas así como los axones de diferentes interneuronas, establecen sus contactos sinápticos en el cuello de la espina dendrítica, o sobre la dendrita, de otras neuronas espinosas medianas. En este último caso se trata sinapsis simétricas de tipo inhibitorio ^[171]. Sin embargo, las neuronas espinosas medianas son inhibitorias GABAérgicas, al igual que la mayor parte de las interneuronas del neocórtex, por lo que se supone que el neocórtex actúa para inhibir sus núcleos blanco ^[205]. De hecho, experimentos electrofisiológicos han demostrado que las neuronas espinosas medianas ejercen un poderoso efecto inhibitorio sobre sus células blanco (globo pálido, sustancia negra), mediado por GABA, y a través de la activación de receptores $GABA_A$ ^[56, 108, 107]. Además, todas las neuronas de proyección poseen colaterales axónicas loca-

les que van dejando ramificaciones cercanas a las dendritas de las células vecinas. Por lo tanto, cuando las neuronas estriatales son excitadas, producen inhibición lateral en las neuronas que están a su alrededor [10, 66, 140, 205]. De este modo, las señales débiles son filtradas por las células que han recibido señales más intensas [10]. Cabe resaltar que los núcleos de salida (GPe, GPi, SNr) también poseen neuronas de proyección que son inhibitorias GABAérgicas. Por lo que se forma un circuito de dos sinapsis en serie entre neuronas GABAérgicas inhibitorias [10, 140].

Las neuronas de proyección del neostriado presentan potenciales de reposo muy polarizados (-80 mV), por lo que para generar potenciales de acción requieren de gran excitación [10]. El glutamato actúa sobre receptores de los tipos AMPA (α - amino - 3 - hidroxí - 5 - metil - isoxazole - 4 - propionato) y NMDA (N - metil - D - aspartato). Este

último mantiene la depolarización de las células (-55 mV) y hace más eficaces las entradas excitatorias por tiempos más prolongados [10]. Las neuronas de proyección de los núcleos de salida de los GB (GPe, GPi, SNr) mantienen un disparo tónico de potenciales de acción a frecuencias que oscilan entre 20 y 100 Hz [10, 140, 205]. Por lo que las neuronas que son inervadas por éstas (tálamicas) están siendo inhibidas de manera tónica.

Cuando las neuronas del estriado son excitadas por las neuronas corticales, producen una disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas de los núcleos de salida, lo que a su vez desinhibe a las neuronas talámicas. Por lo tanto, cuando se activa el neostriado se desinhiben las vías tálamo-corticales, lo que facilita la acción de la vía piramidal [10]. La actividad de las neuronas espinosas medianas de los mamíferos está siendo continuamente modulada

por la actividad de diversas sustancias que son liberadas en el neocórtex. Es posible encontrar modulación por adenosina, dopamina, acetilcolina, opiáceos y serotonina, entre otros [205]. La interacción entre estos sistemas, particularmente entre los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos, es fundamental en la farmacología de los GB, ya que el balance entre los niveles de acetilcolina y dopamina es necesario para la función estriatal normal. El balance dopamina-acetilcolina es regulado por la acción de otros neurotransmisores [23, 150, 151, 205].

En el neocórtex las aferentes excitatorias son glutamatergicas, provienen del tálamo y sobretodo de la corteza [9, 28, 29, 31, 38, 87, 103, 104, 117, 118, 121, 177, 205] tanto en mamíferos como en saurópodos [163]. Sin embargo, en anamniotas parecen prevalecer las conexiones tálamo-estriatales. No parecen existir neuronas glutamatergicas intrínsecas [101, 108, 107]. La sinapsis cortico-estriatal

parece haber surgido durante la transición anamniota-amniota, la sinapsis tálamo-estriatal parece estar altamente conservada tanto en amniotas como en anamniotas [163]. Es posible entonces que las sinapsis cortico-estriatales se hayan sumado a las tálamo-estriatales ya existentes en los anamniotas, durante la transición anamniota-amniota. Por otro lado, las sinapsis inhibitorias (GABAérgicas) son todas intrínsecas, ya sea por conexiones recíprocas entre las mismas neuronas de proyección, o por interneuronas [101, 108, 107, 145, 146, 147]. La preparación cortico-estriatal mantenida *in vitro*, es un modelo adecuado para estudiar la modulación presináptica de las aferentes glutamatergicas corticales [11, 38, 58, 74, 87, 147].

La transmisión sináptica en el neoes- triado

Como ya se menciona, la principal entrada de los ganglios basales es la que proviene de casi todas las áreas de la corteza cerebral y que establece sinapsis con las neuronas espinosas medianas del neoes-triado. En general se conocen algunos circuitos corticales que inciden en el neoes-triado: A) El circuito sensorial motor, cuyas aferencias provienen de las cortezas motora primaria, premotora y suplementaria; que inciden en el putamen B) El circuito oculomotor, con proyecciones de las cortezas parietal posterior, prefrontal y frontal, hacia el cuerpo del caudado. C) El circuito de asociación, que recibe aferencias de las cortezas parietal, premo-tora, y prefrontal dorsolateral, estableciendo sinapsis con neuronas en la cabeza del caudado. Y por último D) El circuito límbico que involucra proyeccio-

nes al núcleo Accumbens y cabeza del caudado ^[116].

Se ha documentado que las aferentes corticales establecen sinapsis glutamatérgicas en las dendritas de las neuronas espinosas medianas probablemente mediadas por la activación de receptores AMPA ^[11, 35, 126], produciendo potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP's) cuando son activadas ^[65, 10, 205]. Las sinapsis excitatorias glutama-térgicas que se establecen con las neuronas neoes-triales, no han sido completamente caracterizadas, aun se desconocen diversos aspectos sobre su modulación y plasticidad ^[76, 116].

Mediante el empleo de la técnica de registro extracelular en rebanadas (Ver Material y Métodos), Yamamoto ^[211] describió que la estimulación dentro del estriado produce una respuesta que se caracteriza por presentar dos prominentes negatividades. La primera

de ellas (N_1) representa la estimulación directa de axones y células intrínsecas, mientras que la segunda negatividad (N_2) representa el potencial de campo mediado sinápticamente [182, 140, 38, 121]. En condiciones de bajo Ca^{2+} y alto Mg^{2+} , se ha encontrado que el componente N_2 disminuye o es abolido, mientras que el componente N_1 permanece inalterado [11, 121]. Resultados similares se observan cuando se produce inhibición presináptica por acción de neuromoduladores. Tanto el componente N_1 como el N_2 disminuyen cuando se bloquean canales de Na^+ dependientes de al voltaje sensibles a tetrodotoxina (TTX) [121]. Registros intracelulares han mostrado que la estimulación intraestriatal produce EPSP's, monosinápticos, que pueden ser abolidos por condiciones de bajo Ca^{2+} y alto Mg^{2+} o en presencia de TTX

o Co^{2+} ; indicando que se trata de eventos sinápticos [140, 1982, 35, 90].

Modulación presináptica por los neurotransmisores y neuromoduladores usados en este estudio.

Receptores Muscarínicos

Se ha reportado que el incremento de ACh en el estriado da como resultado un decremento en la liberación de dopamina, lo que se ha asociado con acinesia y la enfermedad de Parkinson. Del mismo modo cuando la dopamina se incrementa se observa hipercinesia [179], mientras que una disminución en el número de neuronas colinérgicas del estriado ventral se ha relacionado con la enfermedad de Alzheimer [112]. La liberación de ACh es inhibida por GABA y serotonina, y es estimulada por glutamato [23; 150, 151, 205]. Existe evidencia experimental y clínica que muestra que el sistema colinérgico a través de receptores muscarínicos, modifica la presenta-

ción y el curso temporal de algunas alteraciones motoras. En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo los agonistas dopaminérgicos y los antagonistas colinérgicos muscarínicos mejoran algunos de los síntomas de esa enfermedad [125]. Tanto las terminales dopaminérgicas como las colinérgicas convergen junto con las eferentes glutamatérgicas y GABAérgicas sobre las neuronas espinosas medianas del neostriado. Los receptores D₂ parecen localizarse también a nivel presináptico [44], aunque en muy pocas terminales [58]. Por lo que la interacción entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico resulta crucial para el buen funcionamiento de los ganglios basales, ya que el balance entre los niveles de ACh y dopamina va a determinar la función normal del estriado.

La activación de receptores colinérgicos producida por agonistas muscarínicos ha sido demostrada en diferentes estructuras del sistema nervioso

central, tales como hipocampo [159, 168], neuronas simpáticas [124], motoneuronas [15, 16] y la amígdala [180].

En el neostriado, las interneuronas denominadas gigantes liberan acetilcolina (ACh) participando en el control motor [205]. Sin embargo, la ACh, y en particular la activación de receptores muscarínicos tiene efectos tanto presinápticos como postsinápticos [75]. Entre los efectos postsinápticos más importantes se ha reportado que la muscarina, a través de receptores M₁, depolariza a las células espinosas medianas e incrementa la resistencia de entrada [47, 139, 157, 70], por inhibición de las corrientes de potasio y calcio que participan en el disparo, pospotencial hiperpolarizante y rectificación entrante [139, 8, 83, 157, 85].

Presinápticamente, las acciones que produce la activación de receptores muscarínicos se han observado en las propias neuronas colinérgicas [37, 197, 204, 100, 77], en terminales GABAérgicas [180],

así como en las terminales glutamatérgicas que establecen sinapsis con las neuronas de proyección neocorticales [47, 121, 28, 84, 74]. Observaciones similares se han realizado en el estriado ventral [154, 180].

La presencia de receptores muscarínicos sugeriría que la acetilcolina participa en el control de la liberación de glutamato [203]. Sin embargo se desconocen los mecanismos por los cuales los agonistas colinérgicos podrían modular la actividad. Este tipo de respuestas se caracteriza por tener latencias largas, poca amplitud, larga duración [203]. Este efecto se ha asociado con una inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisor, por lo que se ha sugerido la participación de las conductancias de calcio y potasio [203, 121, 210].

Los receptores muscarínicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas-G, con siete segmentos transmembranales unidos

por asas intra- y extracelulares, con el amino terminal extracelular y el carboxilo terminal intracelular [196]. Se han caracterizado farmacológicamente cuatro subtipos de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 y M_4) [128], en todos ellos el asa intracelular entre los segmentos 5 y 6 es muy larga, y es la que muestra las mayores diferencias entre los diferentes tipos de receptores muscarínicos [198]. Se han clonado cinco subtipos de receptores muscarínicos (m_1 , m_2 , m_3 , m_4 y m_5) [20], mismos que se han agrupado en dos subfamilias: La subfamilia M_1 (receptores m_1 , m_3 y m_5) que está acoplada a la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de la subunidad α de proteínas-G del tipo Gq/G11, puesto que es insensible a la toxina Pertussis. Los receptores que pertenecen a la subfamilia M_2 (m_2 y m_4) inhiben la actividad de la adenilato-ciclase por proteínas-G del tipo G1/G0, ya que son sensibles a la toxina Pertussis [114]. Se ha sugerido que los recepto-

es involucrados en la modulación presináptica glutamatérgica en los núcleos *accumbens*, *amígdala* y *estriado* son los receptores M_3 ,^[180] recientemente se ha reportado que tanto los receptores M_2 como los M_3 participan de la modulación presináptica de la sinapsis glutamatérgica corticoestriatal^[76], así como en otras regiones del sistema nervioso central^[203]. Por otro lado, también se sabe que la activación de receptores de tipo M_1 también ejercen modulación presináptica sobre terminales GABAérgicas en los ganglios basales^[180]. Sin embargo se desconoce si la modulación que provoca la activación de receptores muscarínicos se debe a la entrada de Ca^{2+} extracelular a las terminales presinápticas.

Receptores GABAérgicos

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

lógicos^[88, 53]. En el neostriado las neuronas de proyección y varios tipos de interneuronas liberan GABA^[205], el cual actúa sobre receptores $GABA_A$ y $GABA_B$ ^[99]. Sin embargo en las terminales sinápticas predomina la presencia de receptores $GABA_B$ ^[145, 146, 147, 32], particularmente aquellas que provienen de la corteza, ya que el número de receptores $GABA_B$ se reduce después de decorticación crónica^[142] sin que al parecer se vea afectada la distribución postsináptica de receptores $GABA_A$. La activación de receptores $GABA_B$ en la sinapsis cortico-estriatal produce inhibición presináptica en la liberación de glutamato^[90, 145, 146, 147] así como sobre las interneuronas colinérgicas estriatales^[41], y en terminales dopaminérgicas que llegan al neostriado^[174]. Observaciones similares se han hecho en el hipotálamo^[88, 34]. Asimismo también afecta la liberación de GABA por activación de autorreceptores^[170, 22]. Estudios neurológi-

os y electrofisiológicos en diversas regiones cerebrales indican que el efecto mediado por el receptor GABA_B es dependiente de la frecuencia y la intensidad de la estimulación, lo que sugiere que los moduladores presinápticos se activan dependiendo de la actividad sináptica [51; 52, 110]

El receptor GABA_B ha sido implicado en la modulación pre y postsináptica por conductancias de potasio rectificadoras entrantes acopladas a proteínas-G en neuronas del SNC [175]. Su acción se asocia con una reducción en la duración del potencial de acción y por lo tanto en una menor entrada de Ca²⁺ extracelular a la terminal [60, 135]. Sin embargo otros estudios indican que hay pocas evidencias de modulación presináptica por este mecanismo [105, 34, 81, 135, 83]. Inclusive se ha sugerido que pudiera deberse a un mecanismo independiente de la participación de canales de Ca²⁺ y K⁺ [86]

En las terminales sinápticas de diversos núcleos la activación de receptores GABA_B modulan la liberación de GABA, glutamato, noradrenalina, dopamina, sustancia-P y somatostatina entre otros [99]. Se ha propuesto que la activación de los receptores GABA_B presinápticos inhibe la entrada de Ca²⁺ extracelular modulando VDCC [34, 81; 163], por estar acoplados negativamente a la actividad de la adenilato ciclasa [143]. Ya que la acción del baclofen sobre corrientes de Ca²⁺ es antagonizada por forskolina [90] y por análogos del AMPc [187]. En el hipotálamo los VDCC involucrados en la inhibición presináptica mediada por baclofen parecen ser los canales de Ca²⁺ N y P/Q [81]. Mientras que en especies filogenéticamente inferiores esta modulación parece estar mediada únicamente por canales de Ca²⁺ tipo N [191]

Del mismo modo se ha reportado que la inhibición de liberación de gluta-

matismo en sinaptosomas mediado por la activación de receptores GABA_B involucra la PKC [167, 156]. Ya que la activación de esteroides de forbol bloquean el efecto pre- y postsináptico del baclofen, mientras que antagonistas de la PKC la potencian [90].

ipótesis de Trabajo

Algunos transmisores encargados de la modulación presináptica corticoestriatal actúan regulando la entrada de Ca^{2+} .

Los transmisores que no actúan sobre conductancias de Ca^{2+} o de K^+ , podrían estar actuando sobre la maquinaria de liberación

* Algunos de los transmisores que actúan presinápticamente convergen sobre ciertos sistemas de señalización intraterminal.

Objetivos

Generales

• Describir los mecanismos de modulación presináptica glutamatérgica en el neostriado

• Determinar la importancia de estos mecanismos en el funcionamiento de este microcircuito cerebral

rias que llegan al neostriado modulando la liberación de glutamato.

* Determinar si los neurotransmisores propuestos actúan a través de la regulación de la entrada de Ca^{2+} .

* En caso de que un neurotransmisor actúe regulando la entrada de Ca^{2+} , se determinará cual o cuales canales de Ca^{2+} están involucrados (N, P, Q o R).

Particulares

• Investigar si los neurotransmisores GABA y acetilcolina actúan presinápticamente en las terminales excitato-

Material y Métodos

Preparación

Se obtuvieron rebanadas de cerebro de rata Wistar (100-120 g de peso), sin distinción de sexo. Para ello, las ratas previamente anestesiadas con éter etílico, fueron decapitadas, el cerebro fue rápidamente removido y sumergido en solución salina isotónica (en mM: 125.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃, 11.0 Glucosa) saturada con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. En esta etapa se mantuvo una temperatura de 4 ± 1 °C. Se separaron los bulbos olfatorios, el cerebelo y los hemisferios cerebrales. Se obtuvieron las rebanadas de 400 μ m de espesor y se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo no menor a 60 min. En estas condiciones es posible obtener registros confiables de más de 10 hr de duración

[11, 76, 58]

Para cada experimento las rebanadas se trasladaron a una cámara de registro donde se les hizo pasar un flujo constante de 2 ± 0.5 ml/min de solución salina a una temperatura constante de 34 ± 0.5 °C. Todos los fármacos que se utilizaron en el presente trabajo se disolvieron previamente en solución salina y se administraron a través del dispositivo de su perfusión.

Sistema de Estimulación y Registro.

En virtud de que las neuronas espinosas medianas representan más del 90 % de las células del neocórtex, los registros extracelulares mostrados en el presente trabajo corresponden principalmente a respuestas de esta estirpe neuronal. Dichos registros se obtuvieron estimulando las fibras aferentes al neocórtex, con electrodos

ipolares concéntricos de 50 μm en la punta. Los estímulos se obtuvieron por medio de un estimulador, pasándolos a través de una unidad aisladora de estímulos en donde se reguló la intensidad y la duración de los mismos (intensidad: -40 V; duración: 0.01 - 0.04 ms; frecuencia: 0.4-0.06 Hz).

Para el registro de los potenciales de campo se utilizaron técnicas convencionales de amplificación y registro: Se utilizaron electrodos de vidrio fabricados a partir de capilares de borosilicato de 1.0 mm de diámetro externo; con una resistencia en la punta de 2 a 4 $\text{M}\Omega$, con NaCl al 0.9 % como conductor. El potencial de campo se amplificó, se desplegó en el osciloscopio, se digitalizó y se almaceno en vídeo, utilizando el software comercial LabView (National Instruments, Austin TX USA). Posteriormente los registros se midieron, promediaron y graficaron utilizando

software comercial (Origin, Microcal Software. Northampton, MA. USA)

El registro extracelular de potenciales de campo

Los potenciales de campo son registros extracelulares de las corrientes iónicas asociadas a la actividad de una población de neuronas. Las corrientes producen espigas poblacionales debido a la sincronía de muchos 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, sus membranas no producen flujo de corriente. Sin embargo, al ser activadas por un impulso nervioso, la polarización deja de ser uniforme y se producen flujos de corriente de una parte de la neu-

rona a otra, formando un dipolo a través del fluido extracelular; esto establece un campo eléctrico (Fig.7A).

El potencial de campo registrado extracelularmente es una onda trifásica producida por la diferencia de potencial debida al cambio en la localización de los sumideros y las fuentes de corriente activa. A la zona en que las corrientes fluyen hacia el interior de la célula se le denomina sumidero (corrientes entrantes activas) y a la zona en que ésta sale se le llama fuente (corrientes salientes que cierran el circuito) (Fig. 7A). En el registro extracelular, las corrientes salientes se observan como deflexiones positivas en el registro, mientras que las corrientes entrantes se observan como deflexiones negativas (Fig. 7).

Por lo general la medición que hace el electrodo se realiza comparando los voltajes entre el electrodo de registro y la tierra de referencia. A la neurona se le puede considerar como un

dipolo eléctrico ya que durante el pico del potencial de acción en la membrana del soma se da lugar a una corriente activa (sumidero). En las dendritas se da una corriente pasiva (fuente) que cierra el circuito, las cuales son positivas con respecto al soma. Las aferentes sinápticas dan lugar a cambios en estas corrientes. En ese sentido, las entradas sinápticas excitatorias que dan lugar a una corriente entrante en las dendritas (sumidero) producen en el soma corrientes salientes pasivas (fuente). Como estas corrientes cambian con el tiempo, es común obtener ondas trifásicas, que representan la propagación del potencial de acción (Fig. 7A) ^[86]

Cuando se registra cerca de los somas neuronales se observa solamente una onda bifásica que consiste en una espiga negativa seguida de otra positiva. Esto se debe a que el potencial de acción produce una rápida depolarización de la membrana por las corrien

A

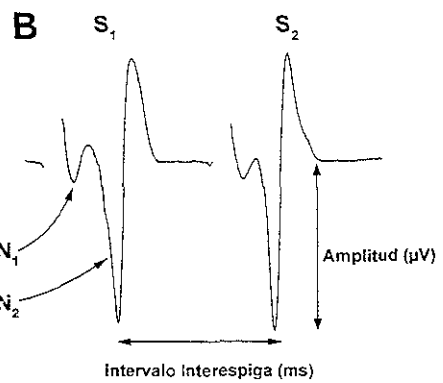
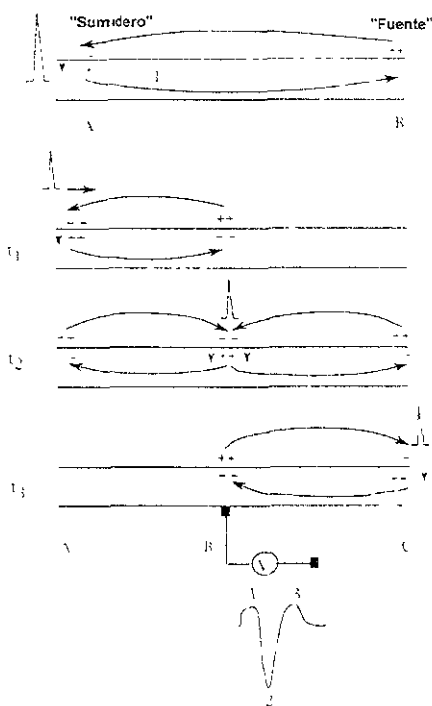


Figura 7. Registro extracelular del potencial de campo. A) En el diagrama superior un potencial de acción es iniciado en A y la corriente (I) fluye de A a B. Los diagramas inferiores ilustran la secuencia ($t_1 < t_2 < t_3$) de propagación del potencial de acción del punto A al B y posteriormente al C. Cuando se registra extracelularmente en el punto B se observa un potencial trifásico [Modificado de BB]. B) Se muestra un registro extracelular obtenido después de estimular las aferentes corticales cerca del cuerpo caloso, el electrodo de registro está colocado en el neocórtex. Se observan dos negatividades (N_1 y N_2), la primera de ellas corresponde al potencial antidrómico, y la segunda al potencial sináptico. Cuando se utiliza el protocolo de facilitación por pulso pareado es posible obtener dos registros (S_1 y S_2) en intervalos de tiempo relativamente cortos (10 – 40 ms). La intensidad del estímulo se ajusta para que la amplitud de S_2 y S_1 sean aproximadamente de la misma magnitud.

tes entrantes de sodio, así como una rápida repolarización por las corrientes salientes de potasio. El componente negativo corresponde a la depolarización de la membrana del soma por el flujo de corriente entrante. La fase positiva corresponde a la reversión en el flujo de corriente [88].

El neocórtico no presenta una estructura laminar como la que se observa en el hipocampo [121], de tal modo que la posición del electrodo varía de un registro a otro; por esta razón se recurre al registro de espigas poblaciones ortodrómicamente. En ellas se pueden observar dos tipos de deflexiones negativas en el registro (Fig. 7B). El que aparece primero (N_1) en el rango de 2 a 4 ms después del artefacto de estimulación, siendo de origen antidrómico, y se debe a estimular el axón de las neuronas espinosas medianas [38, 121, 11], siendo bloqueado por procaina y TTX. Posteriormente se observa la segunda deflexión negativa

(N_2) en el rango de 4 a 8 ms, que es de origen ortodrómicamente o sináptico [38, 121, 118, 11], la cual se obtiene cuando las aferentes corticales que llegan al árbol dendrítico o al soma de la neurona estriatal generando un potencial postsináptico que viaja hacia el cono axónico donde se genera el potencial de acción. Este potencial es bloqueado por bajas concentraciones de Ca^{2+} (0.5 mM de Ca^{2+} ; 6.0 mM de Mg^{2+}). Asimismo el componente N_2 se puede bloquear con TTX, así como con Kinurenato y CNQX, los cuales son conocidos bloqueadores de la transmisión sináptica excitatoria glutamatérgica [121, 134, 11, 40].

Facilitación por Pulso Pareado

La transmisión sináptica presenta diversos tipos de plasticidad a corto plazo en su eficiencia sináptica, mismos que se conocen como facilitación (en el rango de los milisegundos), potenciación (milisegundos a minutos) y poten-

ciación (minutos) ^[120]. Se han planteado varias hipótesis para explicar la facilitación por pulso pareado (PPF). Entre ellos, inactivación de corrientes de K^+ en la terminal presináptica ^[2], lo que provocaría incremento en el influjo de Ca^{2+} extracelular ^[5]. Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco estudiada y no siempre existe un aumento en la duración de la espiga ^[18]. Quizás la hipótesis más aceptada sea la del Ca^{2+} residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's ^[97, 98]. En ésta, cuando se mandan dos estímulos de la misma intensidad en un intervalo corto de tiempo, la amplitud de la respuesta al segundo estímulo generalmente es mayor a la observada en la primera respuesta ^[50]. Katz y Miledi demostraron que este fenómeno puede deberse a que con la llegada del primer estímulo se abren canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, incrementando la concentración intracelular de Ca^{2+} ^[97, 98]. El incremento

en la concentración del Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), en la terminal sináptica de concentraciones nanomolares a concentraciones micro- o submicromolares durante la estimulación persiste por varios segundos ^[91, 213, 214, 215]. Sin embargo, el proceso de liberación de neurotransmisor dura menos de un milisegundo ^[13], por lo que no todo el Ca^{2+} que entra con la depolarización es utilizado y permanece varios milisegundos en el sitio de liberación, debido a la lentitud del amortiguamiento del Ca^{2+} con relación al evento sináptico ^[33, 97, 98, 160]. Así que con la llegada de un segundo estímulo el Ca^{2+} que entra con la nueva depolarización se suma al Ca^{2+} residual que ingreso a la terminal con el primer estímulo ^[4]. Al menos durante un periodo muy breve de tiempo la concentración de Ca^{2+} es mayor, lo que incrementa la probabilidad de fusión de las vesículas ^[132, 152, 40] aumentando la liberación de neurotransmisor ^[33, 91, 213, 214, 215]. Sin

embargo se ha reportado que la amplitud de la respuesta al segundo estímulo se encuentra en función de la amplitud de la primera respuesta. Así si la probabilidad de liberación en primera respuesta es elevada, entonces la probabilidad de liberar en la segunda respuesta será baja ^[40], pues la primera respuesta depleta las vesículas disponibles, tal como se observa en condiciones de alto calcio.

La hipótesis del Ca^{2+} residual se basa en el hecho de que la entrada de Ca^{2+} es esencial para la liberación de neurotransmisor. Pequeñas modificaciones en la concentración de Ca^{2+} extracelular bastan para alterar sensiblemente la aparición espontánea de potenciales miniatura y por lo tanto liberación de neurotransmisor ^[42, 43, 46, 97, 98, 161, 40]. Así, cuando se mandan trenes de estímulos a intervalos cortos de tiempo se observa ya sea un progresivo incremento (facilitación, aumentación o po-

tenciación), o bien, un decremento en la amplitud de las respuestas sinápticas (depresión). Esto se debe al cambio en la cantidad de neurotransmisor liberado ^[43, 40], mismo que se refleja en la frecuencia de los potenciales miniatura con respecto al número de fallas. Sin embargo, la relación entre la entrada de Ca^{2+} extracelular y la cantidad de neurotransmisor liberado no es lineal, y se puede explicar si se asume una acción cooperativa del Ca^{2+} en la liberación de un cuanto de neurotransmisor, la cual varía con la cuarta potencia de la concentración extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). Asumiendo que la cantidad de Ca^{2+} que alcanza los sitios activos durante un impulso es proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, entonces la liberación varía con la concentración de Ca^{2+} activo $[\text{Ca}^{2+}]^n$, donde $n > 1$, que es el Ca^{2+} cercano a los sitios de liberación. Así, la probabilidad de liberación depende de un proceso en la membrana en la cual cerca de cuatro

iones de Ca^{2+} ($n \cong 4$) deben estar presentes simultáneamente en una posición crítica. La cooperatividad es un proceso necesario para que se libere un cuanto de neurotransmisor después de un impulso nervioso [46]. Esto quiere decir que grandes cambios en la liberación de neurotransmisor pueden deberse a pequeños cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} seguida de un pulso nervioso.

Puesto que el influjo de Ca^{2+} a la terminal y la liberación de neurotransmisor no es lineal la PPF debe aumentar si se disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (0.5 - 1 mM) [122, 40], debido al efecto del Ca^{2+} residual [97, 98, 46, 40].

Protocolo experimental

En la mayor parte de los experimentos, se aplicaron dos estímulos de igual intensidad con el fin de determinar la PPF (Fig. 7B). La cual se evaluó co-

mo el cociente entre la amplitud de la respuesta ortodrómica al segundo estímulo (S_2) entre la respuesta al primer estímulo (S_1).

$$PPF = \frac{S_2}{S_1}$$

que expresado en porcentaje queda:

$$\%PPF = 100 \cdot \left(\frac{S_2}{S_1} - 1 \right) \quad (1)$$

Durante el control, la intensidad de los estímulos se ajustó para ver poca o ninguna PPF ($S_2/S_1 \approx 1$). Esto permitió detectar con facilidad los cambios provocados por la administración de los diferentes agonistas a los neuromoduladores, así como aquellos cambios provocados por los bloqueadores de Ca^{2+} . El intervalo interestímulo seleccionado osciló entre 10 y 50 ms. Los experimentos se realizaron en presencia de bicuculina (10 μM) con el fin de eliminar el componente inhibitorio GABA_A .

La ecuación (1) también se utilizó de la siguiente manera: Siendo $S_1 = \%PPF$ en condiciones control, y $S_2 = \%PPF$ después de administrar los agonistas a los neuromoduladores utilizados. Esto permitió utilizar el cambio en la PPF producida por los diferentes agonistas para generar las relaciones concentración – respuesta. Al menos se realizaron cinco experimentos para cada una de las concentraciones de agonista utilizados, y se graficó la media de la PPF \pm error estándar de la media. La curva concentración-respuesta se ajustó con el algoritmo no lineal de Marquardt [76] de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%PPF = \frac{\%PPF_{MAX}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{[Drug]} \right)^n} \quad (2)$$

Donde $\%PPF$ es el porcentaje de PPF incrementado por la administración del agonista; $\%PPF_{MAX}$ es el efecto sa-

turante; EC_{50} es la mitad del efecto máximo; $[Drug]$ es la concentración del agonista utilizado; y n es la pendiente de la función dosis – respuesta, siendo una aproximación al coeficiente de Hill [1, 127]. Los parámetros fueron ajustados utilizando software comercial (Sigma-Plot, Jandel. San Rafael, CA, USA). Del mismo modo, cuando el agonista se administraba después de bloquear las conductancias de Ca^{2+} , se determinó el grado de oclusión producida.

El cociente S_2/S_1 fue medido cada cinco minutos. Una vez que el cociente S_2/S_1 se estabilizó después de bloquear los canales de Ca^{2+} , la intensidad del estímulo se incremento, con el fin de reclutar más aferentes, de tal modo que se recuperó, en la medida de lo posible, los valores control del cociente S_2/S_1 . Esto mejoró la resolución de nuestro sistema para ver los efectos de los agonistas y la participación de los canales de Ca^{2+} no bloqueados por las

toxinas bloqueadoras de dichos canales. Sí el efecto presináptico de los agonistas utilizados actúa bloqueando alguno de los canales de Ca^{2+} presentes en las terminales glutamatérgicas, entonces cuando se bloquea previamente este tipo de canal, el efecto del agonista debe ser ocluido o su PPF debe ser reducida

La significancia estadística entre las muestras se determinó utilizando pruebas estadísticas, paramétrica y no paramétrica (t de Student y U de Mann-Whitney respectivamente. Para ello se utilizó el software comercial SYSTAT (Evanston, IL, USA)

Drogas utilizadas

Se utilizó s(-)-Bay-K 8644, agonista de canal de Ca^{2+} tipo L; muscarina, agonista muscarínico; baclofen, agonista GABA_B , saclofen, antagonista GABA_B ; bicuculina, antagonista GABA_A , 6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

(CNQX), antagonista receptores no-NMDA, D 2-amino-5-fosfonopentanoate (APV), antagonista receptores NMDA. Los cuales fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St Louis MO, USA) o RBI (Natick, MA, USA). ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) y ω -Agatoxina TK (ω -AgTx TK) fueron suministrados por Peptides International (Louisville KY, USA) o Alomone (Israel), los cuales se agregaron a la perfusión de stock's preparados el mismo día

Resultados

Modulación Presináptica: Papel de los Canales de Ca^{2+}

La liberación de neurotransmisor es un fenómeno dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular. Las neuronas poseen diferentes canales de Ca^{2+} , En el neocórtex y en la corteza las neuronas tienen canales de Ca^{2+} de tipo L, N, P, Q y R [12, 59, 130]. Sin embargo los canales de Ca^{2+} reportados en las terminales glutamatérgicas de la sinapsis corticoestriatal son únicamente los canales N, P y Q [11]. Por lo que resulta importante conocer cual o cuales son los canales de Ca^{2+} que participan en la liberación de neurotransmisor, y cual es la contribución de cada uno ellos en la modulación presináptica. Por ello en primer término fue necesario determinar qué efecto tenía el cambio en las concentraciones extracelulares de Ca^{2+} sobre la PPF, con el fin de establecer la contribución del Ca^{2+} extracelular en la

liberación de neurotransmisor. De este modo cuando se selecciona una intensidad de estimulación tal que la amplitud de las respuestas a los estímulos S_1 y S_2 sean similares a concentraciones de Ca^{2+} fisiológicas ($[Ca^{2+}]_o = 2.0$ mM) (PPF = 1.2 ± 0.07 Media \pm S.E.M; mediana = 1.1; n = 8), se puede observar que cuando se disminuye la concentración extracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o = 0.5$ mM) ocurre una disminución en la amplitud de ambas respuestas. Esto se puede correlacionar con una menor entrada de Ca^{2+} , y por lo tanto con una menor liberación de neurotransmisor. Sin embargo, también se observa que la relación entre las amplitudes es diferente ya que la relación S_2/S_1 aumenta, por lo que se dice que hubo un incremento en la PPF (6 ± 0.9 ; mediana = 7.1, n=7, $p < 0.001$; U de Mann-Whitney). Esto se

debe a que la relación entre la entrada de Ca^{2+} con la liberación no es lineal, de tal modo que pequeños cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} pueden provocar grandes cambios en la liberación, haciendo a la sinapsis más eficiente. Tomados juntos, una disminución en la amplitud de las respuestas S_2/S_1 , así como un incremento en la facilitación son evidencias de una inhibición presináptica [97 50, 40, 213, 215]. Por otro lado, cuando se incrementa la concentración extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o = 4.0 \text{ mM}$) ocurre lo contrario, es decir hay un incremento en la amplitud de las respuestas, particularmente en S_1 , y una disminución en la relación S_2/S_1 , que se conoce como "Depresión por Pulso Pareado" (PPF = 0.63 ± 0.1 ; mediana = 0.63 ; $n = 8$; $p < 0.003$; U de Mann-Whitney). Una posible explicación de este evento consiste en que a la llegada del estímulo ocurre una gran entrada de Ca^{2+} que provoca que todas las

vesículas ancladas liberen su contenido al espacio sináptico, a la llegada de un segundo estímulo en un periodo breve de tiempo, no hay suficientes vesículas disponibles y la amplitud del potencial sináptico decrece. Si los eventos observados fueran postsinápticos el bloqueo produciría cambios en la amplitud de la misma magnitud pero no habría cambio en la PPF.

Para demostrar el papel de los canales de calcio de la membrana plasmática de las terminales glutamatergicas se realizó una curva dosis - respuesta del bloqueo con cadmio. En ella observamos un incremento de casi 180 % en la PPF ($179 \pm 12 \%$, $\text{EC}_{50} = 12.8 \pm 0.18 \mu\text{M}$), la aproximación del coeficiente de Hill fue cercana a 1 (1.25 ± 0.18), lo que nos sugiere que el cadmio bloquea por igual a los canales de Ca^{2+} que participan en la liberación de neurotransmisor. Con el fin de determinar que canales de Ca^{2+} están partici-

pando en la liberación de neurotransmisor, realizamos experimentos de oclusión farmacológica utilizando toxinas peptídicas específicas para bloquear selectivamente cada uno de los canales de Ca^{2+} . Trabajos previos mostraron que los canales de Ca^{2+} que participan en la liberación son los canales tipo N y P/Q, la participación de los canales tipo L es mínima, o no participan; mientras que los canales tipo T no se encuentran presentes [80, 11, 117].

Para bloquear los canales tipo N se utilizó ω -CgTx GVIA, el bloqueo de este canal produjo inhibición presináptica. Ya que se observó un incremento en la PPF desde 1.25 ± 0.11 (mediana = 1.07) en el control a 2.3 ± 0.3 (mediana = 2.01) en presencia del péptido ($n = 11$; $p < 0.01$, t de Wilcoxon), indicando su participación en la liberación de glutamato en estas sinapsis. Para bloquear los canales de Ca^{2+} tipo P/Q se utilizó

ω -AgTx TK, que a bajas concentraciones (< 30 nM) bloquea canales de Ca^{2+} tipo P, mientras que a concentraciones mayores bloquea a los canales P y Q (> 200 nM). Altas concentraciones de ω -AgTx TK (400 nM) aumentó la PPF de 1.09 ± 0.05 (mediana = 1.04) en el control a 2.9 ± 0.3 (mediana = 2.7) en presencia de esta toxina ($n = 5$; $p < 0.05$, t de Wilcoxon). Como el cambio en la PPF fue mayor para la ω -AgTx TK que para la ω -CgTx GVIA (151% vs 88%) se realizó una curva dosis respuesta de ω -AgTx TK, con el fin de establecer si participan los canales P o Q. Nuestros datos muestran un efecto máximo de 211% ($\text{EC}_{50} = 127 \pm 18$ nM), obtenido a partir del análisis de doble recíproca Lineweaver-Burk, el cual requiere concentraciones mayores a $1 \mu\text{M}$ un coeficiente de Hill cercano a 1.0 (1.2), lo que sugiere que un sólo tipo de canal de Ca^{2+} sensible a ω -AgTx TK está participando

en la liberación de glutamato en la sinapsis cortico-estriatal. El bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo L con dihidropiridinas (5 μM nitrendipina) no produjo cambios en la PPF ni en la amplitud (datos no mostrados) de forma similar a lo observado previamente. Estos datos sugieren que los principales canales de Ca^{2+} que participan en la liberación son los canales tipo N y Q.

No obstante lo anterior, existe la posibilidad de que los canales de Ca^{2+} tipo L estén presentes en la terminal glutamatérgica, pero no en la zona activa de la sinapsis. Lo que podría explicar su poca o nula participación cuando son bloqueados. Para ello decidimos activar los canales tipo L con Bay K 8644 (5 μM). Nuestros datos muestran que al mantener activados a estos canales se produce una entrada de Ca^{2+} que produce depresión por pulso pareado, ya que la PPF disminuyó de 1.25 ± 0.07 (mediana = 1.16) en el control a $0.65 \pm$

0.1 (mediana = 0.64, $n = 7$, $p < 0.02$, t de Wilcoxon). Lo que sugiere la presencia de los canales de Ca^{2+} tipo L en las terminales glutamatérgicas cortico-estriatales. Sin embargo no sabemos si el efecto observado se debe únicamente a la entrada de Ca^{2+} extracelular por el canal L, o bien si esta entrada de Ca^{2+} pudiera estar activando pozas intracelulares de Ca^{2+} . Dado que su bloqueo (de los canales L) no afecta significativamente la liberación de las terminales corticoestriatales

The calcium channels mostly responsible for glutamate release at corticostriatal synapses are Q-type

Jaime Barral¹, Francisco Poblette¹, Juan C. Pineda², Ernesto Mendoza¹, Elvira Galarraga³, José Bargas^{3*}

¹Neurociencias, ENEP Iztacala, UNAM, Estado de México, ²Centro de Investigaciones Regionales, UADY, Mérida Yucatán, and ³Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México City México

Corresponding author: José Bargas. Instituto de Fisiología Celular, PO Box 70-253, UNAM, México City DF 04510, México. Tel., 525 622 5670. fax.: 525 622 5607 e-mail: jbargas@ifisiol.unam.mx

Abstract

To know which calcium channel types are the most important for neurotransmitter release at the corticostriatal transmission of the rat we tested calcium channel antagonists on the paired pulse ratio. ω -agatoxin-TK was the most effective calcium channel antagonist: IC_{50} = 127 nM; maximal effect = 211 % (with $> 1 \mu\text{M}$) and Hill coefficient = 1.2; suggesting a single site of action and a Q-type channel profile. Corresponding parameters for cadmium were: 13 μM , 178 % and 1.1. The *block* of L-type calcium channels has little impact on transmission, but we also tested *facilitation* of L-type calcium channels. The L-type calcium channel agonist, Bay K 8644 (5 μM), produces a 45 % reduction of the paired pulse ratio suggesting that even if L-type channels do not participate in the release process, they may participate in its modulation.

Keywords: ω -agatoxin-TK, ω -conotoxin GVIA, synaptic transmission, neostriatum, calcium channels,

1. Introduction

Changes in the paired pulse ratio obtained from a pair of orthodromic responses mainly reflect the non-linearity of the presynaptic processes of transmission (Zucker, 1989; 1999). Oppositely, postsynaptic processes do not change the paired pulse ratio under most circumstances but change both orthodromic responses in the same proportion (Dunwiddie and Hass, 1985). A postsynaptic process also changes the antidromic response. Consequently, the paired pulse ratio associated with field population spike recordings is a robust protocol to perform pharmacological screening of receptors located at presynaptic nerve terminals (e.g., Dunwiddie and Hass, 1985; Malenka and Kocsis, 1988; Kahle and Cotman, 1993; Lovinger et al., 1993; Ameri et al., 1999; Barral et al., 1999; 2000). The results obtained with this protocol have been corroborated with more other techniques such as intracellular- and whole-cell recordings (Nisenbaum et al., 1992; Lovinger et al., 1993; Brundage and Dunwiddie, 1996; Hernandez-Echeagaray et al., 1998; Creager et al., 1998; Sullivan, 1999; Gerdeman and Lovinger, 2001).

This work uses the paired pulse ratio to test calcium channel-targeting ligands whose actions are known to be located at corticostriatal terminals (Turner et al., 1993; Lovinger et al., 1994; Bargas et al., 1998; Hill and Brotchie, 1999). Pharmacological analyses of calcium channel antagonists based on the paired pulse ratio coincided with previous results obtained with different techniques in other central neurons (Takahashi and Momiyama, 1993; Wheeler et al., 1994; Teramoto et al., 1995; 1997; Reid et al., 1998; Iwasaki et al., 2000; Turner et al., 1993; Luebke et al., 1993; Dooley et al., 2000).

There is a consensus about the importance of P/Q-type calcium channels ($\alpha 1A$) in the release process. We performed a concentration-response analysis of ω -agatoxin TK to see if it is the P-type, or the Q-type channel. the most important

for release. This question is crucial since recent evidence has suggested a strong convergence of presynaptic modulators onto Q-type calcium channels (Barral et al., 1999; 2000). ω -agatoxin evaluation is compared to that made on cadmium.

On the other hand, calcium entry involved in glutamate release at central synaptic terminals takes place through non-L-type calcium channels (P/Q, N and R or $\alpha 1_A$, $\alpha 1_B$ and $\alpha 1_E$) (Wu and Saggau, 1997; Randall and Benham, 1999). This is the same at the neostriatum, where the block of L-type calcium channels does not affect corticostriatal transmission (Turner et al, 1993; Lovinger et al, 1994; Bargas et al, 1998; Hill and Brotchie, 1999). Nevertheless, what happens if L-type calcium channels are *facilitated*, instead of *blocked*? This point has not been sufficiently explored. We show here that the paired pulse ratio can give a preliminary answer to this question.

2. Methods

Animal treatment in our institution adheres to the European Community guidelines for the use of experimental animals. Dorsal neostriatal brain slices (400 μ m) were obtained from anaesthetized male Wistar rats (100-120 g) as previously described (Bargas et al., 1998). Briefly, sagittal neostriatal slices were cut on a vibratome and incubated at room temperature in saline containing (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 glucose, 0.2 thiourea and 0.2 ascorbic acid (saturated with 95 % O₂ and 5 % CO₂; 298 mOsm/l, pH = 7.4). Individual slices were transferred to a submerged chamber at 33-35 °C. Stimulation of cortical white matter or corpus callosum with concentric bipolar electrodes was used to elicit an orthodromic population spike (N₂) in the neostriatum (Cordingley and Weight, 1986; Malenka and Kocsis, 1988, Lovinger et al., 1993; Bargas et al, 1998). In some cases, a smaller antidromic (N₁) response could also be elicited (Cordingley and Weight, 1986; Bargas et al, 1998) probably due to current diffusion

into the striatal tissue. Field population spikes, a composite of both field excitatory postsynaptic potential and population action potentials, were recorded with micropipettes filled with 0.9 % NaCl and an AC amplifier. Records were digitized and stored on VHS tapes at 40 kHz and analyzed off-line. Illustrations are the average of at least five records. Stimulus were brief square voltage pulses (1 - 40 V; 0.1 - 0.4 ms; 0.06 - 0.2 Hz) delivered with a stimulator. Interstimulus time interval for paired stimuli was 20 - 60 ms. Peptidic toxins were tested in the presence of 10 μ M bicuculline to eliminate the inhibitory GABA_A component (Bargas et al, 1998).

Two stimuli of equal strength were applied to determine the paired pulse ratio: S2 / S1, where S2 is the amplitude of the second and S1 is the amplitude of the first orthodromic response (Figs 1A,C). Stimulus strength was adjusted so that the paired pulse ratio value was near 1.0 in the control recordings. In a set of control experiments the paired pulse ratio was (mean \pm S.E.M.): 1.2 \pm 0.05 (median = 1.1; n = 31). Both the paired pulse ratio or its change in percentage are reported. Concentration-response relationships were generated with percentage changes in the paired pulse ratio produced by calcium channel-targeting ligands (Barral et al., 1999; 2000). The range of responses for concentration-response analysis varies depending on initial conditions, i.e., a control paired pulse ratio value less than 1.0, would increase this range. However, we chose to have a control paired pulse ratio similar to 1.0 since the stimulus strength used for these initial conditions allows a viable preparation for longer time. The dose-response relation was fitted with a non-linear Marquardt algorithm to the Hill equation:

$$\% \text{Paired pulse ratio} = \frac{\% \text{maximal paired pulse ratio}}{(1 + (IC_{50} / [\text{ligand}])^{nH})}$$

where IC₅₀ is the half maximal effect, [ligand] is the concentration of cadmium or ω -agatoxin TK (Figs. 1 and 3), and "nH" is the slope of the concentration-response

function, i.e., an approximation to the Hill coefficient. Parameters were fitted using commercial software (Sigma Plot, Jandel, San Rafael, CA). The term IC_{50} ("inhibitory concentration" 50) is used for half maximal effect, even if concentration-response plots are increasing functions because the increase in the paired pulse ratio is a measure of presynaptic inhibition or a decrease in the probability of transmitter release. Stimulus strength to adjust a paired pulse ratio value near 1 is equal to the strength necessary to have about one third of the maximal population spike amplitude.

2.1. *Drugs*

$CdCl_2$, bicuculline (Sigma, St. Louis MO), ω -conotoxin GVIA, ω -agatoxin TK (Peptides International, Louisville, KY or Alomone, Jerusalem, Israel); nitrendipine and s-(-)-Bay K 8644 (RBI, Natick MA) were all added from freshly prepared stock solutions to the bath saline.

2.2. *Data analysis*

Both parametric (paired or unpaired Student's *t* test) and non-parametric (Mann-Whitney U or Wilcoxon's T tests) were used. $P < 0.05$ indicates statistical significance. Mean, standard error of the mean (S.E.M.) and median are given throughout the text. Statistical test used is indicated in each case.

3. Results

3.1. Changes in external calcium concentration.

Figure 1A top ($[Ca^{2+}]_O = 2.0 \text{ mM}$) illustrates two consecutive orthodromic population spikes evoked by a pair of stimuli of equal strength adjusted to have a paired pulse ratio of about (mean \pm S.E.M.): 1.2 ± 0.07 (median 1.1; $n = 8$). Stimulus strength was not changed when the external calcium concentration became 0.5 mM (Fig. 1A middle) in order to decrease calcium entry to the terminals and lower release probability. Both responses decreased although the second one decreases less. Consequently, the paired pulse ratio increases in low calcium to: 6 ± 0.9 (median = 7.1; $n = 7$; $p < 0.001$; Mann-Whitney U) (e.g., Katz and Miledi, 1968, Dunwiddie and Hass, 1985; Zucker, 1989; 1999; Gerdeman and Lovinger, 2001). This represents a percentage increase of about 500% above the control. In contrast, raising the external calcium concentration to 4.0 mM, to increase calcium entry into the terminals and enhance release probability, produces the opposite effect (Fig. 1A bottom): Paired pulse ratio = 0.63 ± 0.1 (median = 0.63; $n = 8$; $p < 0.003$; Mann-Whitney U). This represents a percentage decrease of about 37% below the control. These changes could be produced consecutively, in the same preparation, and therefore are reversible. If the changes in external calcium were explained by postsynaptic actions, both S2 and S1 responses would have changed in the same proportion. Figure 1B is a summary histogram. These results support the paired pulse ratio in association to population spike recordings for evaluating presynaptic modulation in the corticostriatal preparation.

3.2. Cadmium ions.

Figure 1C illustrates the effect of external cadmium (50 μM) on the paired pulse ratio. Similarly to low external calcium, the paired pulse ratio becomes larger during cadmium due to a block of calcium entry into the synaptic terminals. Note, however, that antidromic responses (N_1) are unchanged; supporting the presynaptic action of cadmium ions. Cadmium action is concentration dependent. A concentration-response plot of percentage change of the paired pulse ratio is illustrated in Figure 1D: $IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$; maximal response = 163% and Hill coefficient = 1.15. Four experiments from slices belonging to different animals were averaged for the summary plot in Figure 1E (mean \pm S.E.M.): $IC_{50} = 12.8 \pm 4 \mu\text{M}$; maximal response = $179 \pm 12\%$ and $nH = 1.25 \pm 0.18$. This suggests that cadmium does not distinguish between the different types of calcium channels employed in release.

3.3. Peptidic calcium channel antagonists.

Both N- and P/Q-type calcium channels have been implicated in glutamate release at corticostriatal terminals (Hill and Brotchie, 1999; Bargas et al, 1998; Lovinger et al, 1994; Turner et al, 1993). In order to have an idea of the relative importance of these different channels, we made the experiment illustrated in Figure 2: It shows paired pulse ratio enhancements in the presence of both ω -conotoxin GVIA (1 μM) and ω -agatoxin TK (400 nM), antagonists of N- and P/Q-type calcium channels, respectively. These results suggest that both peptides act by reducing calcium entry into the terminals and decrease release probability. ω -conotoxin GVIA (1 μM) enhanced the paired pulse ratio from 1.25 ± 0.11 (median = 1.07) in the control to 2.3 ± 0.3 (median = 2.01) in the presence of the peptide ($n =$

11; $p < 0.01$, Wilcoxon's T). ω -agatoxin TK (400 nM) enhanced the paired pulse ratio from 1.09 ± 0.05 (median = 1.04) in control to 2.9 ± 0.3 (median = 2.7) in the presence of the peptide ($n = 5$; $p < 0.05$, Wilcoxon's T). In other words, ω -conotoxin GVIA had less effect than ω -agatoxin TK: 88% vs. 151% change in the paired pulse ratio, respectively (taken from medians; $p < 0.02$; Mann-Whitney U), in spite that conotoxin concentration was higher. Hence, a concentration-response analysis was done for the most potent ligand (ω -agatoxin TK; Fig. 3A) to see if the profile included both P- and Q-type channels, or only one of the two. It included a Lineweaver-Burk analysis (Fig. 3B) to determine the maximal effect (y-intercept in Fig. 3B); which was: 211%; only reached with concentrations larger than $1 \mu\text{M}$ ω -agatoxin TK (see Fig. 3A). The non-linear fit (see Methods) of the concentration-response plot (Fig. 3A), using the maximal response obtained from the Lineweaver-Burk analysis as a constraint, yields an $\text{IC}_{50} = 127 \pm 18 \text{ nM}$. The Marquardt fit of the Hill equation (see Methods) using 24 different slices and experiments yields a Hill coefficient of 1.2, non significantly different than 1.0 and similar to that obtained with cadmium; suggesting that the peptide mostly affects one site at the terminals. These results are very similar to those obtained in other preparations using different methods (Wheeler et al., 1994; Teramoto et al., 1995; 1997)

3.4. Bay K 8644.

Previous work has shown that the block of L-type calcium channels does not affect corticostriatal transmission significantly (Hill and Brotchie, 1999; Bargas et al, 1998, Lovinger et al, 1994; Turner et al, 1993). This is also true for different types of central nerve terminals (Wu and Saggau, 1997; Randall and Benham, 1999). We confirmed this point by using the paired pulse ratio $5 \mu\text{M}$ nitrendipine did not

enhance the paired pulse ratio significantly (not shown; $n = 3$). In spite of this negative result, we decided to test Bay K 8644 ($5 \mu\text{M}$), a selective agonist of L-type calcium channels, to see what happens when L-type calcium channels are *facilitated* instead of *blocked*. Figure 2C shows that Bay K 8644 reduces the paired pulse ratio significantly from 1.25 ± 0.07 (median = 1.16) to 0.65 ± 0.1 (median = 0.64; $n = 7$, $p < 0.02$, Wilcoxon's T). This is a 45% reduction (calculated from medians) from the control, similar to that produced by high external calcium concentrations (see above and Fig. 1A); suggesting that Bay K 8644 increases calcium entry to the terminals.

4. Discussion

The *rationale* of the paired pulse ratio protocol has been previously discussed and validated (e.g., Katz and Miledi, 1968; Dunwiddie and Hass, 1985, Zucker, 1989, 1999; Gerdeman and Lovinger, 2001). The types of calcium channels involved in glutamate release at the corticostriatal terminals have been previously reported with different methods (Hill and Brotchie, 1999, Bargas et al, 1998, Lovinger et al, 1994; Turner et al, 1993). As in other systems (Wu and Saggau, 1997, Randall and Benham, 1999), N- and P/Q-types, but not L-type calcium channels, are in charge of triggering transmitter release. Based on this previous knowledge, this work used the paired pulse ratio protocol to perform a concentration-response analysis of ω -agatoxin TK on corticostriatal terminals to see which channel type, P or Q, is the most important for corticostriatal transmission. This analysis was compared to a concentration-response analysis of Cd^{2+} action. In addition, a comparison between ω -agatoxin TK and ω -conotoxin GVIA, using the paired pulse ratio, showed that the most potent peptide was ω -agatoxin TK. It is concluded that, in the present experimental conditions, Q-type

channels appear as the most important for transmitter release at these terminals

4.1 The paired pulse ratio in the corticostriatal preparation

The paired pulse ratio increased when release probability was low and decreased when release probability was high. Since the neostriatum is not a laminar structure as the hippocampus or cortex, these experiments (Figs 1A,B) show that the protocol is still valid in non-laminar structures provided the excitatory transmission is isolated (with bicuculline). These experiments support the results described below

Cadmium acted in the micromolar range ($IC_{50} = 13 \mu M$) with a Hill coefficient that suggests that the ion does not distinguish between different high voltage activated calcium channels. Saturation is achieved with concentrations larger than $50 \mu M$. These values are similar to those found with different techniques in other preparations (rev. in Wu and Saggau, 1997)

4.2 Peptidic calcium channel antagonists

Both ω -conotoxin GVIA and ω -agatoxin TK enhance the paired pulse ratio. Therefore, calcium entry through N- and P/Q-types of calcium channel are in charge of neurotransmitter release at corticostriatal terminals (Hill and Brotchie, 1999, Bargas et al, 1998, Lovinger et al, 1994; Turner et al, 1993).

The paired pulse ratio also indicated that ω -agatoxin is a more potent blocker of transmission than ω -conotoxin GVIA, at corticostriatal terminals. This is the case in other mammalian central nerve terminals in charge of fast transmission (Takahashi and Momiyama, 1993, Wheeler et al, 1994, Teramoto et al., 1995, 1997, Iwasaki and Takahashi, 1998, Iwasaki et al, 2000). Although N- and P/Q-

type calcium channels are in charge of transmitter release in different classes of embryonic central neurons (Reid et al., 1998; Iwasaki et al., 2000), some neurons suffer a developmental switch, so that only P/Q-type channels remain in the mature cells (Iwasaki and Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000). In contrast, some other neurons keep using both N- and P/Q-type calcium channels up to the adult age. Among the later stand the pyramidal cortical and hippocampal neurons (Wu and Saggau, 1997; Iwasaki et al., 2000). Since corticostriatal terminals come from pyramidal neurons, the paired pulse ratio protocol was able to detect the involvement of both N- and P/Q-type channels in corticostriatal transmission and, moreover, the relative importance of each channel type (Takahashi and Momiyama, 1993; Tareilus and Breer, 1995; Wu and Saggau, 1997; Randall and Benham, 1999; Iwasaki et al., 2000; Dooley et al., 2000). Furthermore, the concentration-response analysis of ω -agatoxin TK showed a Q-type, not a P-type profile ($IC_{50} = 127$ nM). In addition, the Hill coefficient for ω -agatoxin was not significantly different than 1.0, suggesting that one molecular target is affected. This agrees with previous electrophysiological findings in pyramidal cells (Takahashi and Momiyama, 1993; Wheeler et al., 1994), but disagrees with a recent report saying that both P- and Q-type calcium channels participate in the 4-aminopyridine (4-AP)-evoked release of glutamate from striatal synaptosomes (Hill and Brotchie, 1999).

Three hypotheses may explain this disagreement: a) the paired pulse ratio protocol associated with population spikes had not enough resolution to detect P-type calcium channels. However, even in this case, the portion blocked by Q-type channels would be larger than that blocked by P-type channels since lower ω -agatoxin concentrations (< 50 μ M) were included into the concentration-response plot (Fig. 3). Nevertheless, the unconstrained fit to the Hill equation (see Methods) yields a Hill coefficient near 1.0 and an IC_{50} proper of Q-type channels (127 nM).

b) A synaptosomal preparation includes both thalamic and cortical glutamatergic terminals. Thalamic terminals may use P-type calcium channels for release (Iwasaki et al., 2000). And c) the above study (Hill and Brotchie, 1999) used 4-aminopyridine to evoke release. 4-aminopyridine changes release efficacy at these terminals (Flores-Hernandez et al., 1994) and that may change ω -agatoxin potency or disclose P-type channels. Further experiments are needed to elucidate these points.

4.3 A role for L-type calcium channels?

A decrease in the paired pulse ratio was produced by the L-type calcium channel agonist, Bay K 8644 (Fig. 2C), similar to that produced by high external calcium concentrations (Figs. 1A,B); suggesting that this agonist increases calcium entry into the terminals. This was surprising because the block of L-type calcium channels does not affect release significantly (Hill and Brotchie, 1999; Bargas et al, 1998; Lovinger et al, 1994; Turner et al, 1993). Nevertheless, calcium currents of the L-type can be disclosed at synaptic terminals (Urbano and Uchitel, 1999) even when their blockage does not affect release. Moreover, dihydropyridines enhance evoked release under certain conditions (Rosato-Siri and Uchitel, 1999). It is, therefore, the blocking action on release what is absent. This asymmetry of dihydropyridines' action suggests that, although L-type calcium channels do not participate in the release process, they still could participate in its modulation through some transmitter that enhances L-type calcium current. This point deserves further investigation

Acknowledgments

Authors are grateful to M.C. Vilchis for her technical assistance. J. Barral was a fellow of PASPA-DGAPA-UNAM and E. Mendoza was a fellow of PROBETEL-UNAM. This work was supported by the following grants to J. Bargas: DGAPA-UNAM: IN202300, CONACyT: 31839-N; FIRCA-NIH and The Millenium Scientific Initiative: W-8072.

References

- Ameri, A., Wilhelm, A., Simmet, T., 1999 Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neural activity in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1831-1839.
- Bargas, J., Ayala, G.X., Hernández, E., Galarraga, E., 1998. Ca^{2+} channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res. Bull.* 45, 521-524
- Barral, J., Galarraga, E., Bargas, J., 1999 Q-type Ca^{2+} channels mediate muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents. *Brain Res. Bull.* 49, 285-289.
- Barral, J., Toro, S., Galarraga, E., Bargas, J., 2000. GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels. *Neurosci. Lett.* 283, 33-36.
- Brundege, J.M., Dunwiddie, T.V., 1996. Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 15, 5603-5612
- Cordingley, G.E., Weight, F.F., 1986. Non-cholinergic synaptic excitation in

- neostriatum: Pharmacological evidence for mediation by a glutamate-like transmitter. *Br. J. Pharmacol.* 88, 847-856.
- Creager, R., Dunwiddie, T.V., Lynch, G., 1988. Paired pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond)*, 299, 409-424.
- Dooley, D.J., Mieske, C.A., Borosky, S.A., 2000. Inhibition of K(+)-evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci. Lett.* 280, 107-110.
- Dunwiddie, T.V., Hass, H.L., 1985. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus. Evidence for a presynaptic site of action. *J. Physiol.* 369: 365-377
- Flores-Hernandez, J., Galarraga, E., Pineda, J.C., Bargas, J., 1994. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J. Neurophysiol.* 72, 2246-2256.
- Gerdeman, G., Lovinger, D.M., 2001. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsal striatum. *J. Neurophysiol.* 85, 468-471
- Hernández-Echeagaray, E., Galarraga, E., Bargas, J., 1998. 3- α -chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacol.* 37, 1493-1502.
- Hill, M.P., Brotchie, J.M., 1999. Control of glutamate release by calcium channels and kappa-opioid receptors in rodent and primate striatum. *Br. J. Pharmacol.* 127, 275-283
- Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O.D., Takahashi, T., 2000. Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J. Neurosci.* 20, 59-65.
- Iwasaki, S., Takahashi, T., 1998. Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J. Physiol.*

- (Lond) 509, 419-423.
- Kahle, J.S., Cotman, C W., 1993. Adenosine, L-AP4, and baclofen modulation of paired pulse potentiation in dentate gyrus Interstimulus interval-dependent pharmacology. *Exp Brain Res.* 94, 97-104
- Katz, B , Miledi, R., 1968 The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol. (Lond)* 195, 481-492.
- Lovinger, D.M., Merritt, A and Reyes, D., 1994. Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neurosci* 62, 31-40.
- Lovinger, D.M., Tyler, E., Fidler, S., Merritt, A , 1993 Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J Neurophysiol.* 69, 1236-1244.
- Luebke J.I., Dunlap, K., Turner, T.J., 1993. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11, 895-902.
- Malenka, R C., Kocsis, J D., 1988. Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neurosci.* 8, 3750-3756.
- Nisenbaum, E.S., Berger, T.W., Grace, A A., 1992. Presynaptic modulation by GABA_B receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 67, 477-481
- Randall, A., Benham, C.D., 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol. Cell Neurosci* 14, 255-272
- Reid, C.A., Bekkers, J M., Clements, J D., 1998. N- and P/Q-type Ca²⁺ channels mediate transmitter release with a similar cooperativity at rat hippocampal autapses *J Neurosci.* 18, 2849-2855.
- Rosato-Siri, M.D., Uchitel, O.D , 1999 Calcium channels coupled to

- neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol.* (Lond) 514, 533-540.
- Sullivan, J.M., 1999. Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurophysiol* 82, 1286-1294.
- Takahashi, T., Momiyama, A., 1993. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366. 156-158.
- Tarelius, E., Breer, H , 1995. Presynaptic calcium channels pharmacology and regulation. *Neurochem Int.* 26, 539-558.
- Teramoto, T., Niidome, T , Kimura, M., Ohgoh, M., Nishizawa, Y., Katayama, K., Mayumi, T., Sawada, K , 1997. A novel type of calcium channel sensitive to ω -agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res* 756, 225-230
- Teramoto, T , Niidome, T., Miyagawa, T., Nishizawa, Y., Katayama, K . Sawada, K., 1995. Two types of calcium channels sensitive to ω -agatoxin-TK in cultured rat hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 1684-1688.
- Turner, T.J., Adams, M.E., Dunlap, K., 1993. Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9518-9522.
- Urbano, F.J., Uchitel, O.D., 1999, L-type calcium channels unmasked by cell-permeant Ca^{2+} buffer at mouse motor nerve terminals. *Pflügers. Arch.* 437, 523-528.
- Wheeler, D.B., Randall, A., Tsien, R.W., 1994. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107-111
- Wu, L G., Saggau, P., 1997 Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release *Trends Neurosci* 20, 204-212.
- Zucker, R S., 1989. Short-term plasticity. *Ann. Rev. Neurosci* 12, 13-31

Zucker, R.S , 1999. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity *Curr Opin. Neurobiol.* 19, 305-313.

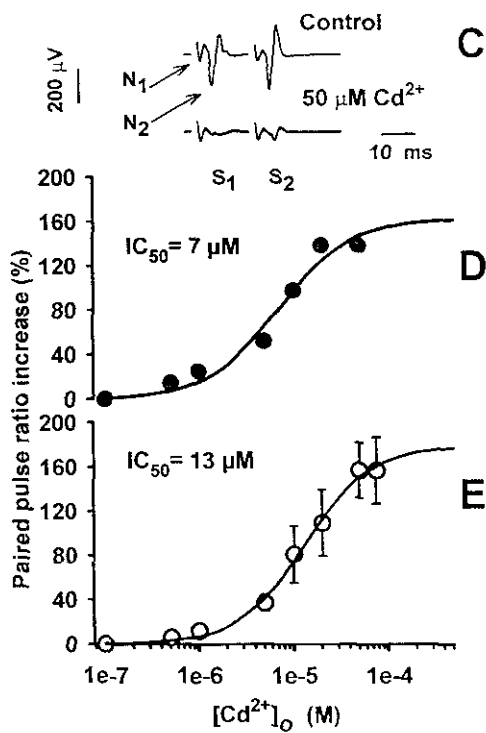
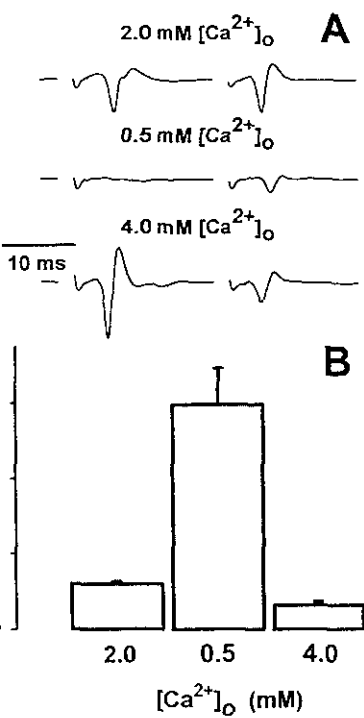
Figure Legends

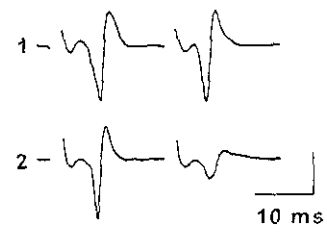
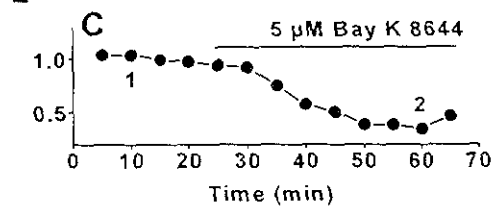
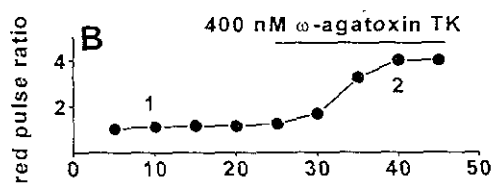
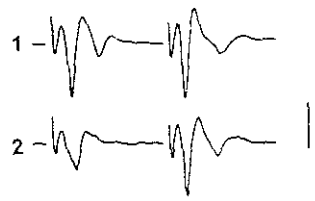
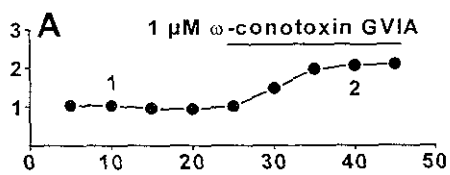
Figure 1. The paired pulse ratio. A. Top trace shows a pair of population spikes evoked with the same stimulus strength in saline with 2 mM external calcium. Paired pulse ratio ≈ 1 . Middle trace shows responses after reducing external calcium to 0.5 mM. There is paired pulse facilitation. Both responses decrease in amplitude. Bottom trace shows responses during 4.0 mM external calcium. There is paired pulse depression. The first response is larger. B. A summary histogram of eight experiments as in A yields paired pulse ratios for (mean \pm S.E.M.): 2 mM external calcium = 1.2 ± 0.07 (median 1.1; $n = 8$); 0.5 mM external calcium = 6 ± 0.9 (median = 7.1; $n = 7$; $p < 0.001$; Mann-Whitney U); 4 mM external calcium = 0.63 ± 0.1 (median = 0.63, $n = 8$, $p < 0.003$, Mann-Whitney U). C. The control shows a pair of orthodromic population spikes (N_2) with a paired pulse ratio ≈ 1 . Antidromic population spikes are also present (N_1). 50 μ M external cadmium reduces both orthodromic population spikes and enhances the paired pulse ratio. Antidromic population spikes do not change during cadmium. D. A representative concentration-response plot for a single brain slice: $IC_{50} = 7.1 \mu$ M; maximal response = 163% and $nH = 1.15$. E. A summary concentration-response plot including four slices as in D: $IC_{50} = 12.8 \pm 4 \mu$ M; maximal response = $179 \pm 12\%$ and $nH = 1.25 \pm 0.18$.

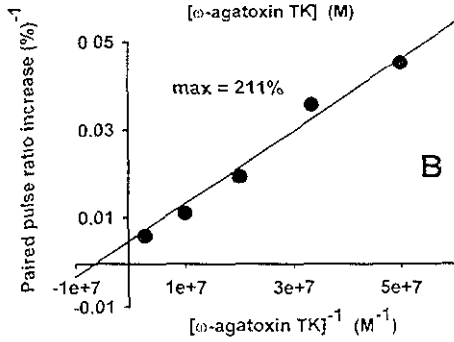
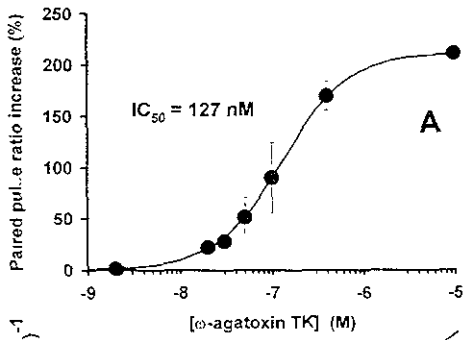
Figure 2. Actions of calcium channel-targeting ligands on the paired pulse ratio. A. Time course of the paired pulse ratio before and during bath superfusion of 1 μ M ω -conotoxin GVIA. The paired pulse ratio is increased during ω -conotoxin GVIA from 1.25 ± 0.11 (median = 1.07) in the control to 2.3 ± 0.3 (median = 2.01) in the presence of the peptide ($n = 11$, $p < 0.01$, Wilcoxon's T). Thus, the block of N-type calcium channels decreases release probability at corticostriatal terminals.

Representative records at right. Numbers to recording time at left. Horizontal bar indicates time of ligand superfusion. B. The paired pulse ratio is enhanced with 400 nM ω -agatoxin TK, from: 1.09 ± 0.05 (median = 1.04) in control to 2.9 ± 0.3 (median = 2.7) in the presence of the peptide ($n = 5$; $p < 0.05$, Wilcoxon's T). Thus, the block of P/Q-type calcium channels decreases release probability at corticostriatal terminals. C. The paired pulse ratio is reduced by 5 μ M Bay K 8644 from: 1.25 ± 0.07 (median = 1.16) to 0.65 ± 0.1 (median = 0.64; $n = 7$; $p < 0.02$; Wilcoxon's T), indicating that facilitation of L-type calcium channels enhances release probability at corticostriatal terminals.

Figure 3. Concentration-response analysis of ω -agatoxin TK. A. Concentration-response relationship for ω -agatoxin TK using the increase in percentage of the paired pulse ratio. Plot was built from 24 slices and experiments. Each point is the mean \pm S.E.M. of at least 4 experiments in different slices. B. A Lineweaver-Burk analysis was used to obtain maximal effect (y-intercept) = 211% $r = 0.97$. Maximal response obtained with the double reciprocal plot was used to constraint the Marquardt fit of the Hill equation in A to obtain: $IC_{50} = 127$ nM and $nH = 1.2$; $r = 0.92$. Maximal response is achieved with concentrations larger than 1 μ M ω -agatoxin TK (which were not tested).







Modulación Presináptica: Papel de los Receptores Colinérgicos.

Después de haber observado la modulación presináptica producida por el bloqueo de conductancias de Ca^{2+} en la sinapsis cortico-estriatal, decidimos probar si la liberación de glutamato en la sinapsis cortico-estriatal era susceptible de ser modulada por la activación de diversos receptores en la presinapsis. En ese sentido existen evidencias de que la acetilcolina modula presinápticamente la liberación de glutamato de las aferentes cortico-estriatales [28, 76, 84, 180] de forma inhibitoria a través de receptores muscarínicos del tipo M_2 y M_3 [76]. Por lo que decidimos determinar que canales de Ca^{2+} de las aferentes cortico-estriatales eran susceptibles de ser modulados presinápticamente por la activación de receptores muscarínicos.

En primer término caracterizamos la inhibición presináptica producida por

la activación de receptores muscarínicos ya que la activación de receptores nicotínicos no produjo inhibición presináptica (datos no mostrados). Nuestros datos muestran que la aplicación de concentraciones muy bajas de muscarina (0.5 – 50 nM) produjo inhibición presináptica, la cual se observa como un incremento en la PPF dependiente de la concentración, alcanzando una PPF máxima de $245 \pm 16\%$ con respecto al control. Con concentraciones de 20 nM, con una $EC_{50} = 2.5 \pm 1.5$ nM, la aproximación al coeficiente de Hill observada fue significativamente mayor a 1.0 (1.68 ± 0.37), lo que nos indica cooperatividad, la cual es usualmente observada cuando los receptores están asociados a cascadas de señalización intracelular [1]. Los datos confirman reportes previos al observar que las acciones presinápti-

cas mediadas por la activación de receptores colinérgicos parecen ocurrir a concentraciones submicromolares o nanomolares [28, 76, 84] siendo muy inferiores a las concentraciones utilizadas para observar efectos postsinápticos [76, 157]

Con el fin de determinar sobre cual o cuales canales de Ca^{2+} están actuando los receptores muscarínicos utilizamos las toxinas peptídicas descritas anteriormente para bloquear selectivamente las conductancias de Ca^{2+} . En ese sentido observamos que la inhibición presináptica producida por la muscarina persiste aún después de bloquear los canales de Ca^{2+} tipo N con ω -CgTx GVIA (1 μ m), así como los canales de Ca^{2+} tipo P con ω -AgTx TK (10 - 40 nM). Sin embargo este efecto fue casi completamente ocluido cuando se realiza en presencia de ω -AgTx TK a concentraciones mayores (400 nM),

esto sugiere que la activación de receptores muscarínicos en la sinapsis cortico-estriatal produce inhibición presináptica a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} de tipo Q. Esto implica que a pesar de que en la zona activa de la terminal existen varios canales de Ca^{2+} , los únicos susceptibles de ser modulados por la muscarina son los canales de tipo Q

Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels

J. Barral,^{1*} E. Galarraga² and J. Bargas²

¹Neurociencias, ENEP Iztacala, UNAM, México City, México, ²Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México City, México

ABSTRACT: Cholinergic presynaptic inhibition was investigated on neostriatal glutamatergic transmission. Paired pulse facilitation (PPF) of orthodromic population spikes (PS) were used to construct a concentration-response relationship for muscarine on presynaptic inhibition. Muscarine had an effect proportional to its extracellular concentration with an EC_{50} (mean \pm standard estimation error) of: 2.5 ± 1.5 nM, and a maximal effect (saturation) of $245 \pm 16\%$. Several peptidic toxins against some voltage-gated Ca^{2+} -channels increased PPF indicating that the Ca^{2+} -channels they block participate in transmitter release. However, neither $1 \mu M$ ω -conotoxin GVIA, a specific blocker of N-type Ca^{2+} -channels, nor $10-30$ nM ω -agatoxinTK, a selective blocker of P-type Ca^{2+} -channels, were able to occlude muscarine's effect on presynaptic inhibition. Nevertheless, $100-400$ nM ω -agatoxinTK occluded muscarine's action on PPF in a dose-dependent manner. These results are consistent with Q-type Ca^{2+} -channels mediating muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal afferents. © 1999 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Neostriatum, Muscarine, Presynaptic inhibition, Ca^{2+} channels, Conotoxins, Agatoxins.

INTRODUCTION

By using different experimental paradigms, several groups have asserted that acetylcholine modulates neostriatal glutamatergic afferents presynaptically [5,6,8,11,14,19]. This presynaptic modulation is inhibitory and may involve muscarinic receptors of the M_2 and/or M_3 receptor types [8,9,11,19].

It is also known that evoked glutamate release by neostriatal afferents requires the participation of both N- and P/Q-types of Ca^{2+} channels, but not of L-type of Ca^{2+} channels [3,13,20]. Since evoked release by synaptic terminals can be modulated by transmitters via the control of presynaptic Ca^{2+} channels through intracellular signaling cascades [23], in the present work we wanted to find out which type of Ca^{2+} channel is involved in the muscarinic control of neostriatal glutamatergic afferents.

MATERIALS AND METHODS

Anesthetized adult Wistar rats (< 2 months) were decapitated and their brains rapidly dissected and cut sagittally in a vibratome. Dorsal neostriatal slices ($100 \mu m$) separated from cortex were then

kept in a $95\% O_2$ and $5\% CO_2$ saturated bathing solution containing (in mM): $125 NaCl$, $3.0 KCl$, $1.0 MgCl_2$, $2.0 CaCl_2$, $25 NaHCO_3$, and 10 glucose ($298 mOsm/L$ with glucose and pH 7.4 with NaOH). After 1-h incubation, the slices were delivered to a recording chamber at $32-34^\circ C$. The superfusion rate was $1-2 ml/min$. Since the neostriatum is not a laminar structure and the recording electrode cannot be selectively located on the dendritic arbors, field stimulation elicit orthodromic or synaptically driven population spikes (PS). Records were obtained with micropipettes filled with $0.9\% NaCl$ ($2-4 M\Omega$) and an AC amplifier. Recordings were digitized and saved on VHS tapes at $40 kHz$ to be analyzed off-line. Illustrations are the average of at least five records. Field stimulation was done with a concentric bipolar electrode. Stimuli were paired brief square current pulses ($< 100 \mu s$; $2-20 V$, $0.2 Hz$) delivered with a stimulator. Normally, stimulus strength is $40-50\%$ of that necessary to have maximal stimulation. Time interval between the pair of stimuli was $15-50 ms$. Bicuculline ($10 \mu M$) was added to the bathing medium to eliminate the inhibitory component of the synaptic response (e.g., [15]). $6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione$ (CNQX) ($10 \mu M$) plus $50 \mu M$ 2-amino-phosphonovaleric acid (APV) and bicuculline blocked all evoked synaptic activity, confirming that no other source of fast ligand-gated synaptic transmission other than GABA and glutamate impinge upon medium spiny neostriatal output neurons [12,13].

The paired pulse facilitation protocol (PPF) is commonly used to assess presynaptic modulation, i.e., presynaptic inhibition would increase PPF (e.g., [1,7,8]). The percentage of PPF (%PPF) was expressed as the percent increase of the S_2/S_1 ratio, S_2 being the second and S_1 the first synaptic response:

$$\%PPF = 100 \cdot (S_2/S_1 - 1) \quad [1]$$

Equation (1) was also used in another way. $S_1 = \%PPF$ in control conditions and $S_2 = \%PPF$ during muscarine in order to use the enhancement of PPF produced by muscarine to generate a concentration-response relationship. At least four experiments were done for each muscarine concentration and mean \pm SEM are depicted in each graph point. The concentration response curve was fitted with a nonlinear Marquardt algorithm to the following equation:

$$PPF(\text{drug}) = PPF(\text{max})/[1 + (IC_{50}/[drug])^n] \quad [2]$$

* Address for correspondence: José Barral, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box 70783, México City, D.F. 04510, México. Tel: 052 55 5607 1333; fax: 052 55 5607 1333; e-mail: jrbarral@icloud.unam.mx

Where $\%PPF(\text{drug}) =$ the percentage PPF increased by muscarine; $\%PPF(\text{max}) =$ the saturating effect, $EC_{50} =$ the half maximal effect, $[\text{musc}] =$ the muscarine concentration and n is the slope of the dose-response function, i.e., an approximation to the Hill coefficient.

Parameters are reported by this software package (Sigma Plot-Jandel, San Rafael, CA, USA) as the best fitted estimate \pm the standard estimation error. When muscarine and a Ca^{2+} channel blocker were added together, a degree of occlusion between both treatments was assessed.

A simple S_2/S_1 ratio was monitored every 5 min to build time course plots of peptidic toxins and muscarinic actions. PS amplitude and S_2/S_1 ratio are variable because they depend on many factors. However, effects of treatments were seen in each slice, changes are reported as percentages (see Fig. 3), and the effect of muscarine at saturating concentrations (20 nM) distributed normally. As expected, a Ca^{2+} channel blocker induces an enhancement of the S_2/S_1 ratio (PPF) due to the blockage of presynaptic Ca^{2+} channels involved in the release process (e.g., [3,7]). However, antagonists of the L-type Ca^{2+} channel did not produce PPF changes (not shown, but see [3]). Once the S_2/S_1 ratio was stable for a given toxin, the stimulus strength was increased in order to get a decrease in the S_2/S_1 ratio (to improve the resolution for muscarine's action and to increase the participation of the Ca^{2+} channels not blocked by the toxin). In some occasions the original (control) S_2/S_1 ratio could be recovered (Fig. 2B). Muscarine was then added in the presence of the toxin. If a given type of Ca^{2+} channel is necessary for the presynaptic action of muscarine, then the blockage of this channel type should occlude the muscarinic action.

Muscarine, CNQX, and APV (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA or RBI, Natick, MA, USA), ω -Conotoxin GVIA (ω -CgTx-GVIA) and ω -Agatoxin-TK (ω -AgTx-TK) (Peptides Int., Louisville, KY, USA) were all added from freshly prepared stock solutions to the bath saline. Statistical significance between samples was searched with parametric and nonparametric tests (Students *t*-test and Mann-Whitney *U*-test, respectively, using SYSTAT, Evanston, IL, USA).

RESULTS

Figure 1 shows a concentration-response relationship for the muscarinic cholinergic receptor agonist muscarine on its ability to enhance PPF. This plot was built after several experiments in different slices (see Material and Methods). When tested on PPF, muscarine clearly acts in the nanomolar range with an EC_{50} of (mean \pm standard estimation error) 2.5 ± 1.5 nM. Saturation of the effect was achieved at: $245 \pm 16\%$. The slope of the concentration-response function (n in Eq. 2) yields: 1.68 ± 0.37 . The inset shows representative records from one experiment; it is shown that increases in PPF are accompanied by decreases in synaptically driven PS amplitude ($N_2 =$ orthodromic PS). However, the antidromic PS (N_1) is not facilitated during S_2 and is not changed by muscarine, suggesting that both the reduction in orthodromic PS and the enhancement of S_2/S_1 ratio (PPF) are due to a presynaptic muscarinic action.

Figures 2A-C shows that peptidic toxins known as Ca^{2+} channel antagonists, ω -Conotoxin GVIA (1 μ M) and ω -Agatoxin TK (10–400 nM) enhance PPF (this is seen as an increase in the S_2/S_1 ratio), and thus produce presynaptic inhibition [7]. This effect is expected because these peptidic toxins are highly specific at the concentrations used and it has been shown that N-, P- and Q types of Ca^{2+} channels cooperate to evoke glutamate release at the neuronal afferents [3,13,20]. Figures 2A,B also show that the blockage of most N- or P-type Ca^{2+} channels by 1 μ M ω -Conotoxin GVIA or 10–40 nM ω -Agatoxin TK, respectively, did not stop muscarine from enhancing PPF (Figs. 2A,B). Moreover, the

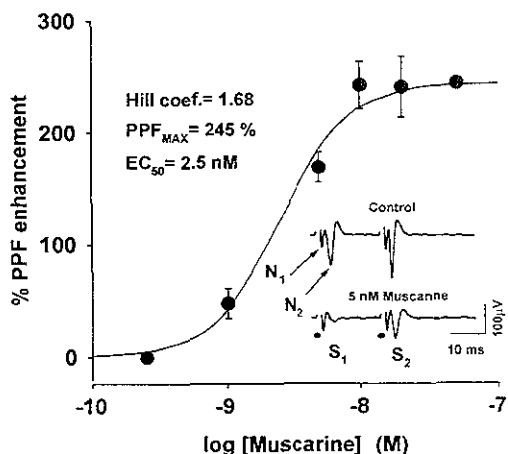


FIG. 1 Concentration-response relationship for muscarine on paired pulse facilitation (PPF). PPF enhancement by muscarine is concentration-dependent in the nanomolar range. EC_{50} (mean \pm standard estimation error) = 2.5 ± 1.5 nM, saturation = $245 \pm 16\%$ and n (slope) = 1.68 ± 0.37 (each graph point represents at least four experiments in different slices and the whole plot represents experiments in 27 slices; each point is the mean \pm standard error of the mean). The inset shows exemplary records. Both antidromic (N_1) and orthodromic (N_2) population spikes are present in this experiment. The control conditions had some PPF (stimulus was that necessary to obtain half maximal amplitude). Muscarine reduced both orthodromic population spikes (S_1 and S_2) and their ratio (S_2/S_1) was greatly increased. Note that antidromic spikes did not change during muscarine, discarding postsynaptic effects.

PPF enhancement due to muscarine in the presence of these peptides was similar to the one found in the control conditions (Fig. 3). Therefore, the blockage of N- and P-type of Ca^{2+} channels did not occlude presynaptic inhibition by muscarine. Note that 10 nM ω -Agatoxin TK already produces a great PPF enhancement (Fig. 2B). The effects of low doses of ω -Agatoxin TK indicates that P-type Ca^{2+} channels are involved in the excitation-release coupling at these synapses. However, up to 40 nM ω -Agatoxin TK did not occlude muscarine effects on PPF (not shown); the effects of these higher doses being nonsignificantly different than those of 10 or 30 nM (Fig. 3, $n = 6$). Nevertheless, when ω -Agatoxin TK was increased to 100 or 400 nM, in order to block a substantial part of the Q-type Ca^{2+} channels, muscarine was not longer able to produce a PPF enhancement (Fig. 2C). Its effects were totally occluded. This suggests that muscarine inhibits glutamatergic afferents through modulation of Q-type Ca^{2+} channels.

These experiments are summarized in the histogram of Fig. 3. Effects with both 100 and 400 nM of ω -Agatoxin TK were significant ($p < 0.008$ and $p < 0.001$, respectively; Mann-Whitney *U*-test). In fact, 400 nM of the peptide occludes most, and in some cases all, of muscarine's action on PPF. Effects with 10 nM ω -Agatoxin TK are not shown because they were not significantly different than the effects obtained with 10 nM.

DISCUSSION

The present experiments show evidence that supports the Q type of Ca^{2+} channels mediating the muscarinic presynaptic inh-

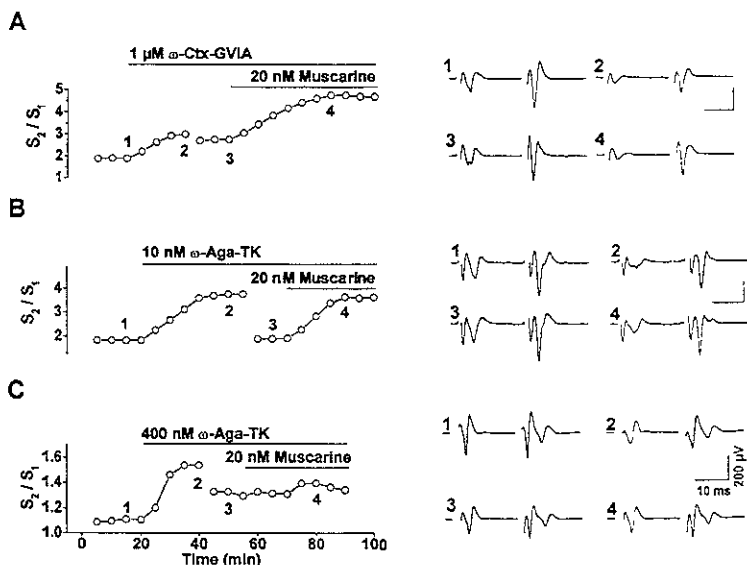
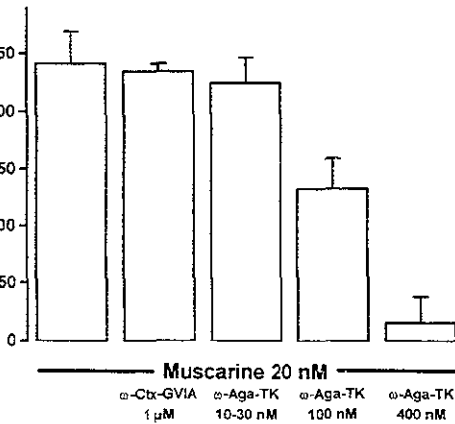


FIG 2 Muscarinic action on paired pulse facilitation (PPF) is occluded by high concentrations of ω -Agatoxin TK. (A) Time course of one experiment shows that PPF (S_2/S_1 ratio) is enhanced by $1 \mu\text{M}$ ω -Conotoxin GVIA indicating that N-type Ca^{2+} -channels participate in release. Numbered records at right in each row (A-C) were obtained where indicated in the time course plot (left). Note that population spike (PS) amplitude (N_2) reductions accompany the changes in S_2/S_1 ratio (cf., records 1 and 2). After a stable S_2/S_1 ratio was achieved, the stimulus strength was increased in order to decrease the S_2/S_1 ratio as much as possible (record 3, see Material and Methods). Addition of 20 nM muscarine in these conditions was able to enhance the S_2/S_1 ratio again even in the presence of ω -Conotoxin GVIA ($n = 6$) (cf. records 3 and 4). Horizontal bars indicate time of drug superfusion. (B) A similar experiment with 10 nM ω -Agatoxin TK is shown. Note that S_2/S_1 ratio is clearly enhanced by 10 nM of this toxin suggesting that P-type Ca^{2+} -channels participate in controlling glutamate release in these afferents. However, control S_2/S_1 ratio is nearly achieved after increasing stimulus strength and 20 nM muscarine were still able to enhance PPF after P-type Ca^{2+} channels were blocked ($n = 4$). Four other experiments confirmed this result with 30 or 40 nM ω -Agatoxin TK. (C) 400 nM ω -Agatoxin TK (P- and Q-types Ca^{2+} channel blocker) increased PPF as expected. A partial recovery of the S_2/S_1 ratio was achieved after increasing stimulus strength. It can be seen that after this concentration of ω -Agatoxin TK muscarine was unable to produce a PPF enhancement ($n = 7$).

of glutamatergic neostriatal afferents. In addition, a concentration-response relationship of muscarinic presynaptic inhibition is reported by way of evaluating the degree of PPF it produced. These data confirms previous reports [5,6,8,11,14,19] and support that cholinergic presynaptic actions on neostriatal afferents occur in the submicromolar or nanomolar range ([5,8,11]; see [4]). However, other electrophysiological studies on cholinergic presynaptic inhibition in the central nervous system, including the striatum, have used cholinergic agonists in the micromolar range (e.g., [2,19,21,22]). This discrepancy could be due to different experimental paradigms. The present data, used population recordings [3] and is in agreement with previous data using intracellular recordings [5,8]. The S_2/S_1 ratio (PPF) was the variable used since it is considered a better measure of presynaptic inhibition [7].

At micromolar concentrations, muscarinic activation has important postsynaptic consequences in neostriatal spiny neurons [16], e.g., an increase in input resistance. These effects are not present at the nanomolar concentrations used here [8,16]. The PPF paradigm would greatly separate presynaptic from postsynaptic

effects [1,7]. Nonetheless, it is reassuring to know that a logarithmic difference in agonist concentration separates effective pre- from effective postsynaptic actions. Thus, this work shows that the presynaptic effects occur at much lower concentrations than the postsynaptic ones [8]. However, since the neostriatum is not a lamellar structure and field stimulation cannot isolate the population synaptic response from the population action potential, it may be thought that presynaptic effects are contaminated with postsynaptic actions. However, and in addition to the differences in effective muscarinic concentrations, the following arguments make us to think that presynaptic effects are better reflected on PPF: (a) Antidromic population spikes do not change. A change in antidromic population spike would be expected if some postsynaptic effects were present on the firing mechanism. (b) Antagonists of the L-type channel, that do affect postsynaptic properties, do not affect PPF. (c) Both muscarine and Ca^{2+} channel antagonists for N- and P/Q-type channels reduce the first and second orthodromic responses simultaneously, although not in the same proportion. Thus, the S_2/S_1 ratio is enhanced. A postsynaptic effect would be reflected by a change in both responses in the same proportion.



Summary of muscarine's action in the absence and presence of the channel antagonists. Histogram shows that in the presence of 1 μ M oxtrotoxin GVIA and 10–30 nM ω -Agatoxin TK to produce the block of N- and P-types of Ca^{2+} channels, respectively, muscarine's action on PPF is not occluded. In fact, muscarine's action on PPF during toxin superfusion was not significantly different than that in the absence of the toxins. However, after the blockade of the Q-type Ca^{2+} channels with 100 ($n = 5$) or 400 nM ($n = 7$) ω -Agatoxin TK, the PPF enhancement produced by 20 nM muscarine was reduced significantly ($p < 0.008$ and $p < 0.001$, respectively, Mann-Whitney U-test).

over, facilitation of N- and P/Q-type currents, due to G-protein modulation, is expected when a conditioning prepulse is (not smaller) than the second (test) response. PPF shows an inverse relation between the first and second responses. (d) The increase in PPF seen with population spike recording matches that with intracellular recordings [8]. Therefore, even if the population response is not purely synaptic and includes population facilitation, the PPF enhancement is most likely due to presynaptic facilitation and not to postsynaptic changes.

The Hill approximation to the Hill coefficient was significantly greater than one, in agreement with previous data using α -chloroalprenolol, a reputed M_2 -receptor antagonist [8]. However, this finding would only indicate cooperativity, which is usually found when receptors are linked to intracellular signaling cascades. Nevertheless, several studies have found that both M_2 and M_3 muscarinic receptor antagonists are able to block muscarinic presynaptic facilitation similarly ([8,11,19]; see also [4]). Both M_2 and M_3 type receptor proteins are found on neostriatal asymmetrical afferents [9]. And both M_2 and M_3 selective antagonists have concentration-response plots with Hill coefficients near unity [8]. Therefore, ligand-binding studies at the subcellular level and/or the use of more specific muscarinic toxins [10,17], are needed to determine the receptor heterogeneity of these afferents.

Our hundred nM ω -Agatoxin TK were able to occlude muscarinic presynaptic inhibition on neostriatal afferents in a virtually complete manner. This concentration of the peptide implies the blockade of Q-type Ca^{2+} channels. This suggests that although all N- and Q-types of Ca^{2+} channels participate in glutamate release in neostriatal afferents [3], muscarine only interferes with the Ca^{2+} channels' function to produce presynaptic inhibition and the mechanism of this interference needs further experi-

mentation. However, it is worth noting that, on the hippocampus, muscarinic receptor agonists interfered with the N-type of Ca^{2+} channels, and not with the P/Q-type [18]. Also, all M_1 , M_2 , and M_3 receptors have been implicated in muscarinic presynaptic inhibition in different systems [2,4,19,22]. This shows that the same transmitter may use different receptors, intracellular signaling, and molecular targets, to produce presynaptic inhibition in different cerebral nuclei and afferents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by DGAPA-UNAM grants IN201597 and IN201397 to J. Bargas and E.G., respectively, and CONACyT (México) grant 400346-5-25812-N to E.G.

J. Barral was a fellow of PASPA-DGAPA. We thank the technical assistance of M.C. Vilchis and D. Tapia.

REFERENCES

- Andreasen, M. S., Hablitz, J. J. Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: A patch-clamp study in rat hippocampus in vitro. *J Neurosci* 7: 326–336, 1995.
- Bagetta, G., Constanti, A. Muscarinic suppression of the evoked N-wave by oxotremorine-M recorded in the guinea-pig olfactory cortex slice. *Eur J Pharmacol* 178: 91–96, 1990.
- Bargas, J., Ayala, G. X., Hernández, E., Galarraga, E. Ca^{2+} -channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull* 45: 521–524, 1998.
- Bellingham, M. C., Berger, A. Presynaptic depression of excitatory synaptic inputs to rat hypoglossal motoneurons by muscarinic M_2 receptors. *J Neurophysiol* 76: 3758–3770, 1996.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., Bernardi, G. Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog Brain Res* 99: 299–308, 1993.
- Dodd, H. U., Miggeld, L. Muscarinic slow excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum. *J Physiol (Lond)* 380: 593–608, 1986.
- Dunwiddie, T. V., Haas, H. L. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol (Lond)* 369: 365–377, 1985.
- Hernández-Echeagaray, E.; Galarraga, E.; Bargas, J. 3- α -chloro-imipramine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37: 1493–1503, 1998.
- Hersch, S. M., Gutekunst, C.-A., Rees, H. D., Heifman, C. J., Levey, A. I. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: Light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 14: 3351–3363, 1994.
- Hersch, S. M.; Levey, A. I. Immunocytochemical localization of M_1 - M_4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in the striatum. In: Ariano, M. A., Surmeier, D. J., eds. *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. Austin, TX: R. G. Landes; 1995:35–44.
- Hsu, K. S.; Huang, C. C.; Gean, P. W. Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M_3 receptors in the rat neostriatum. *Neurosci Lett* 197: 141–144, 1995.
- Jiang, Z. G., North, R. A. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J Physiol (Lond)* 443: 533–553, 1991.
- Lovinger, D. M., Merritt, A., Reyes, D. Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neuroscience* 62: 31–40, 1994.
- Malenka, R. C.; Kossler, J. D. Presynaptic actions of carbachol and adenosine on cortical synaptic transmission studied in vitro. *J Neurosci* 8: 3750–3756, 1988.
- Nisenbaum, E., Berger, L. W. Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs—II. In vitro analysis. *Neurosci* 48: 579–593, 1992.
- Pineda, J. C., Bargas, J., Flores-Hernández, J., Galarraga, E. Muscarinic receptors modulate the atypical population potential in neostriatal neurons. *Can J Physiol* 78: 271–277, 1998.

- 7 Potier, L. T., Purkerson, S. L. Pharmacology of striatal cholinergic receptors. In Ariano, M. A., Surmeier, D. J. eds. *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. Austin, TX: R. G. Landes, 1995: 241-254.
- 8 Qian, J., Saggau, P. Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: Involvement of presynaptic calcium influx. *Br J Pharmacol* 122:511-519, 1997.
- 9 Sugita, S., Uchimura, N., Jiang, Z.-G., North, R. A. Distinct muscarinic receptors inhibit release of γ -aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *PNAS U S A* 88:2608-2611, 1991.
- 20 Turner, T. J., Adams, M. E., Dunlap, K. Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *PNAS U S A* 90:9518-9522, 1993.
- 21 Valentino, R. J., Dingledine, R. Presynaptic inhibitory effects of acetylcholine in the hippocampus. *J Neurosci* 7:784-792, 1981.
- 22 Williams, S. H., Johnston, D. Muscarinic cholinergic inhibition of glutamatergic transmission. In Dunwiddie, T. V., Lovinger, D. M., eds. *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. Boston: Birkhauser, 1993: 27-41.
- 23 Wu, L.-G., Saggau, P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *TINS* 20:204-212, 1997.

Modulación Presináptica: Papel de los Receptores GABAérgicos.

En el caso de los receptores GABAérgicos, existen evidencias de que el GABA inhibe presinápticamente las aferentes glutamatérgicas neocorticales a través de la activación de receptores GABA_B [29, 138, 146, 147], esta modulación presináptica involucra vías de señalización mediadas por proteínas-G y bloqueo de los canales de Ca²⁺ que producen una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado [138]. En la sinapsis cortico-estriatal, aún no se han determinado cual o cuales canales de Ca²⁺ son susceptibles de ser modulados presinápticamente por la activación de receptores GABA_B. Mientras que los receptores GABA_A actúan postsinápticamente. Por ello en primer término analizamos el efecto del baclofen, un antagonista específico de receptores GABA_B. En este caso observamos que el efecto del baclofen sobre la PPF es de-

pendiente de la concentración mostrando una PPF máxima de $457 \pm 37 \%$ con respecto al control ($2-10 \mu\text{M}$), la EC₅₀ observada fue de $574 \pm 25 \text{ nM}$ y la aproximación del coeficiente de Hill fue de 2.2, en este caso nos indica cooperatividad ya que se trata de receptores acoplados a vías intracelulares de señalización [1]. La aplicación de baclofen en presencia de saclofen ($500 \mu\text{M}$), un antagonista específico, no produjo cambios en la PPF, sin embargo cuando el antagonista es removido del baño de perfusión se observa la inhibición presináptica producida por el baclofen

Con el fin de establecer qué canales de Ca²⁺ están participando de esta modulación se hicieron experimentos de oclusión farmacológica con las toxinas que bloquean canales de Ca²⁺. De forma similar a lo observado con la activación de receptores muscarínicos,

ni el bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo N, ni el bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo P impidieron la inhibición presináptica producida por la activación de los receptores GABA_B . Sin embargo, cuando los canales de Ca^{2+} tipos P y Q se bloquean con 400 nM de ω -AgTx TK, la acción del baclofen se ve casi completamente ocluida. Por lo que se concluye que la modulación presináptica producida por la activación de receptores GABA_B en la sinapsis cortico-estriatal está mediada por canales de Ca^{2+} de tipo Q. Estos datos sugieren que a pesar de que la liberación de neurotransmisor depende de la entrada de Ca^{2+} extracelular por los canales de tipo N, P y Q, sólo el canal de tipo Q es susceptible de ser modulado por el GABA.

GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels

Jaime Barral^a, Silvia Toro^b, Elvira Galarraga^b, José Bargas^{b,*}

^aNeurociencias, ENEP Iztacala, UNAM, Estado de México, Mexico

^bInstituto de Fisiología Celular, PO Box 70-253, UNAM, Mexico City DF 04510, Mexico

Received 6 December 1999; received in revised form 5 February 2000, accepted 9 February 2000

Abstract

Population spikes associated with the paired pulse facilitation paradigm have been successfully used to measure synaptic inhibition in several systems. In the present work, this paradigm was used to evaluate the action of baclofen on neostriatal glutamatergic transmission. Baclofen enhanced synaptic facilitation with an $\text{EC}_{50} = 0.57 \mu\text{M}$ and a maximal effect of 457%. Selective antagonists for N-, P- and Q-type Ca^{2+} -channels enhanced paired pulse facilitation, suggesting that these channel types participate in the release of transmitter. Nevertheless, neither $1 \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA, nor $1 \mu\text{M}$ ω -agatoxinTK occluded the action of baclofen. Baclofen's action was occluded only by 400 nM ω -agatoxinTK. These data suggest that Q-type Ca^{2+} -channels mediate γ -aminobutyric acid_B presynaptic inhibition of neostriatal afferents. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: γ -Aminobutyric acid_B receptors; Baclofen; Presynaptic inhibition; Neostriatum; Calcium channels; Conotoxins; Agatoxins

It has been demonstrated that γ -aminobutyric acid (GABA) presynaptically inhibits neostriatal glutamatergic afferents through the activation of GABA_B receptors [9,13–15]. Presynaptic modulation due to GABA_B receptor activation involves G-protein signaling and inhibition of presynaptic Ca^{2+} channels leading to a reduction in neurotransmitter release [13,18].

N-, P- and Q-type Ca^{2+} channels but not L-type Ca^{2+} channels, are necessary to evoke glutamate release from neostriatal afferents [3]. These Ca^{2+} channel types are expressed by cortical neurons that project to the neostriatum [2]. Therefore, the present work intends to answer if one of these Ca^{2+} channels is required for the presynaptic inhibition mediated by GABA_B receptor activation or if all Ca^{2+} channel types participate.

Orthodromically evoked population spikes (PS) are the result of the simultaneous synaptic response of several neurons. Thus, PS and the paired pulse facilitation (PPF) paradigm have been used in pharmacological assays to find concentration–response relationships that make the basis for more detailed studies [11]. Since the function that relates intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with transmitter release is non-linear

[19], the addition of Ca^{2+} entering during a second response (S2), to the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ remaining from the first response (S1), will produce a non-linear increase in transmitter release. Thus, ‘residual Ca^{2+} ’ is responsible for the synaptic enhancement during the paired pulse facilitation (PPF) paradigm [19,20]. Either a decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or presynaptic inhibition involving a reduction in Ca^{2+} entry, will cause a reduction in the first response (S1) and a relative increase in the second response (S2) [2,7,8]. Post-synaptic modulation usually preserves the S2/S1 ratio [7–9,11,19]. Moreover, several reports that used PS with the PPF paradigm faithfully predicted presynaptic inhibition; which was later corroborated with intracellular or whole-cell recording techniques [2,4,5,8,10,16]. As a consequence, the PPF paradigm has been considered a strong evidence for presynaptic inhibition, and it was used here to address the role of N-, P-, and Q-type channels in the presynaptic inhibition induced by baclofen.

Dorsal neostriatal brain slices (400 μm) were obtained from anesthetized Wistar rats (100–120 g) as described elsewhere [3,10]. Slices were kept in a 95% O_2 and 5% CO_2 saturated bathing solution containing (in mM): 125 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl_2 , 2.0 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , and 10 glucose (298 mOsm/l) with glucose and pH 7.4 with NaOH. The recording chamber (32–34°C) had a superfusion rate of 2 ml/min. Stimulation of corpus callosum with

*Corresponding author. Tel.: +525 622 5670, fax: +525 622-5677.

E-mail address: jbarra@fisiof.unam.mx (J. Barras).

centric bipolar electrodes was used to elicit an orthodromic PS in the neostriatum [3] which was recorded with pipettes filled with 0.9% NaCl (2–4 MΩ) and an AC amplifier. Records were digitized and saved on VHS tapes at 1000 Hz and analyzed off-line. Illustrations are the average of at least five records.

Two stimuli of equal strength were applied to determine paired-pulse facilitation (PPF). PPF is the ratio S_2/S_1 , expressed in percentage [4], S_2 being the second and S_1 the first orthodromic response

$$PPF = 100 \cdot (S_2/S_1 - 1) \quad (1)$$

Control stimuli were adjusted to see little or no PPF ($S_2/S_1 \approx 1$). This allowed us to see easily the PPF provoked by baclofen or Ca^{2+} antagonists (Fig. 2). Interstimulus interval was 20–50 ms (4–20 V; 100–200 μs, 0.1–0.2 Hz). Bicuculline (10 μM) was used to eliminate the inhibitory BA_A component [14].

Eq. (1) can also be used as follows: $S_1 = \%PPF$ in control conditions and $S_2 = \%PPF$ during baclofen. This allows to plot the PPF enhancement produced by baclofen to generate a concentration-response relationship (Fig. 1). At least five experiments were done for each baclofen concentration and an average \pm SEM plotted. The concentration-response curve was fitted with a non-linear Marquardt algorithm to the following equation

$$PPF = \%PPF(max) / (1 + (EC_{50}/[baclo])^n) \quad (2)$$

where $\%PPF$ is the percentage PPF increased by baclofen, $PPF(max)$ is the saturating effect, EC_{50} is the half maximal effect, $[baclo]$ is the baclofen concentration and n is the slope of the dose-response function, i.e. an approximation to the Hill coefficient. Parameters were fitted using commercial software (Sigma Plot-Jandel, San Rafael, CA). When baclofen was added after a Ca^{2+} channel blocker, the degree of occlusion of the baclofen effect was assessed.

S_2/S_1 ratio was measured every 5 min. Once the S_2/S_1 ratio was stable in the presence of a Ca^{2+} channel antagonist, the stimulus strength was increased to recruit more afferents in order to recover, as much as possible, the control S_2/S_1 ratio. This improved the resolution to see baclofen's action and increased the participation of Ca^{2+} channels not blocked by the Ca^{2+} channel antagonist. If a given type of Ca^{2+} channel is necessary for the presynaptic action of baclofen, then the blockade of this channel type should occlude or reduce baclofen's induced PPF. Baclofen, saclofen, bicuculline, CNQX, and APV (Sigma, St. Louis MO or T. Natick, MA), ω -Conotoxin GVIA (ω -Cg1aGVIA) (Tocris Laboratories, Bristol, UK), ω -Agatoxin-TK (ω -AgTx-TK) (Peptides Int. Louisville, KY or Alomone, Israel) were added from freshly prepared stock solutions to the bath saline. Cytochrome c (0.1 mg/ml) was used in some experiments in which superfusion maintained a low concentration of ω -AgTx-TK. However, our results did not differ with or without the carrier. Statistical significance between samples was searched with para-

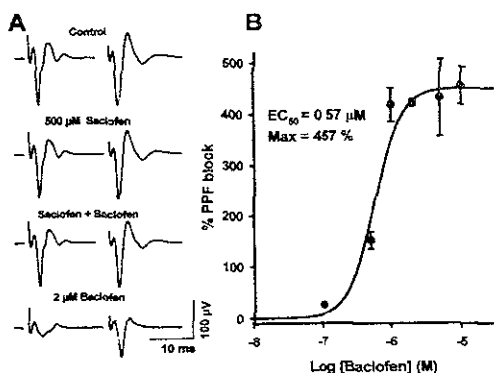


Fig. 1. Concentration-response relationship for baclofen on PPF. (A) From top to bottom: Control depicts a pair of orthodromic population spikes in response to a pair of stimuli of equal strength on corpus callosum. Strength was adjusted to have $S_2/S_1 \approx 1$. Addition of saclofen (500 μM) does not change S_2/S_1 ratio significantly. Addition of baclofen (2 μM) in the presence of saclofen does produce some PPF. However, when the $GABA_B$ receptor antagonist, saclofen, is removed, full baclofen action can be observed (cf. top and bottom traces). Note that in addition of PPF enhancement there is a decrease in the amplitude of both responses. (B) Percentage of PPF enhancement is plotted against different baclofen concentrations in semilogarithmic scale. EC_{50} (mean \pm SEM) = 574 \pm 25 nM. Saturation = 457 \pm 37%. Each point represents at least five experiments in different slices. The whole plot was obtained from 42 different experiments and slices.

metric and non-parametric tests (Student's t - and Mann-Whitney's U , respectively, using SYSTAT, Evanston, IL).

Fig. 1 illustrates the action of baclofen on striatal field potentials. Fig. 1A shows a representative pair of orthodromic responses subject to different treatments. A high concentration of saclofen (500 μM) did not produce a significant change in the responses, but a small increase in PPF could be detected when baclofen (2 μM) was added. However, when the $GABA_B$ receptor antagonist saclofen was removed from the superfusion, the action of baclofen could be seen as a great enhancement of PPF (bottom), accompanied by the reduction in orthodromic responses. Notice that the initial antidromic PS does not change [3]. Thus, the PPF paradigm using PS is consistent with previous data asserting that baclofen induces presynaptic inhibition of neostriatal afferents [6,14,15]. Fig. 1B illustrates that the action of baclofen on PPF is concentration-dependent. It shows saturation at 457 \pm 37% (mean \pm SEM, $P < 0.001$), EC_{50} of 574 \pm 25 nM (mean \pm estimation error) and Hill coefficient of 2.2, indicating cooperativity. Cooperativity is usually found when agonist actions are transduced by intracellular signaling cascades [11].

Since N- and P- and Q-type Ca^{2+} channels are involved in glutamate release from neostriatal afferents [3,4], experiments were carried out with Ca^{2+} channel antagonists in order to see which type of Ca^{2+} channel mediates

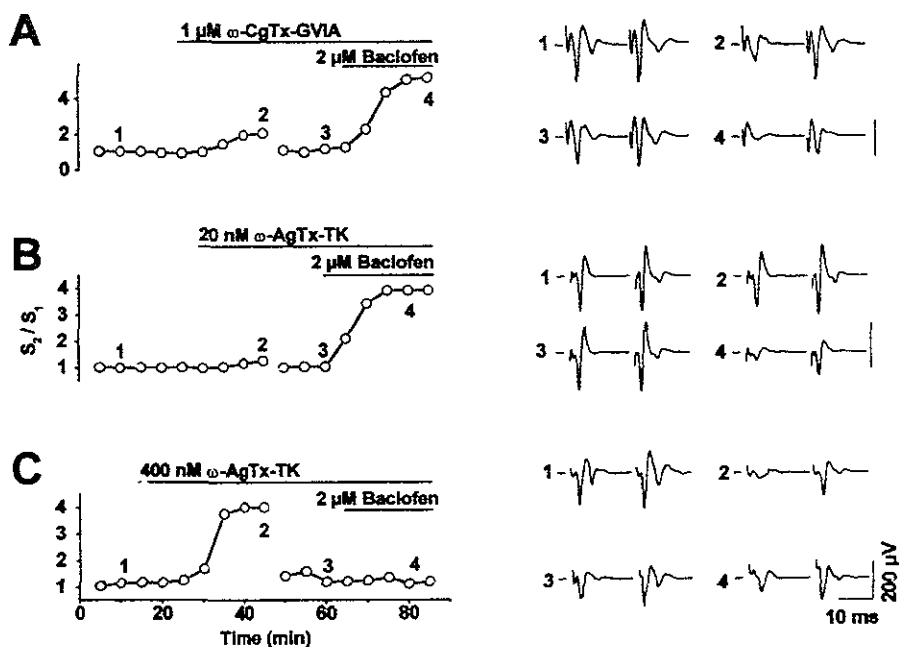


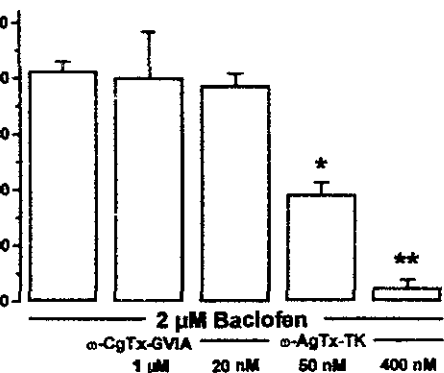
Fig. 2. Occlusion experiments with selective antagonists of Ca^{2+} channels. Left: time course of representative experiments. Right: representative records from experiments at left. Numbers correspond to recording time. Horizontal bars indicate time of drug superfusion. (A) PPF (S_2/S_1) is enhanced by $1 \mu\text{M}$ of $\omega\text{-CgTx-GVIA}$, indicating that N-type Ca^{2+} channels participate in the release process (cf. records 1 and 2). Stimulus strength was increased to return to original S_2/S_1 ratios as much as possible (record 3). Addition of $2 \mu\text{M}$ baclofen enhanced PPF even if N-type Ca^{2+} channels are blocked ($n = 5$) (cf., 3 and 4). (B) A similar experiment with 20 nM $\omega\text{-AgTx-TK}$ occludes the great effect of baclofen (cf., 3 and 4; $n = 6$) in the presence of $\omega\text{-AgTx-TK}$ at a concentration that blocks most P-type Ca^{2+} channels. (C) 400 nM $\omega\text{-AgTx-TK}$ enhanced PPF and occluded baclofen's action ($n = 6$).

of baclofen's ($2 \mu\text{M}$) effects. $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ ($1 \mu\text{M}$) and $\omega\text{-AgTx-TK}$ (20 nM) [1,17], administered at saturating concentrations to block N- and P-type Ca^{2+} channels, respectively [1,17,18], did not occlude the action of baclofen (Fig. 2A,B). Nonetheless, these Ca^{2+} blockers enhanced PPF, suggesting the participation of N- and P-type Ca^{2+} channels in transmitter release by these afferents [1]. However, when $\omega\text{-AgTx-TK}$ was used at a concentration of 400 nM , which blocks a part of the Q-type Ca^{2+} channels [17], the effect of baclofen on PPF was occluded (Fig. 2C; $P < 0.006$). 50 nM $\omega\text{-AgTx-TX}$ also reduced PPF ($P < 0.01$, Fig. 3). Fig. 3 summarizes these experiments.

These results confirmed that in the neostriatum [3], as in other systems [18], N-, P- and Q-type Ca^{2+} channels are responsible for glutamatergic transmission. The PPF paradigm also confirmed that baclofen acts in a dose-dependent way as a presynaptic inhibitor of glutamatergic afferents [4,15], which is also true for other cerebral nuclei [3]. The selective antagonists for Ca^{2+} channels [1,17] showed that although N-, P-, and Q-type Ca^{2+} channel antagonists enhance PPF indicating that these Ca^{2+} chan-

nels participate in glutamatergic transmission, only the Q-type Ca^{2+} channels are likely to mediate GABAergic presynaptic inhibition. Thus, $\omega\text{-CgTx-GVIA}$, a blocker of N-type Ca^{2+} channels, given at a saturating concentration, did not reduce baclofen action on PPF. Baclofen's action in the presence of $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ was not significantly different than that in the control (Fig. 3). The same was true when $\omega\text{-AgTx-TK}$ was used at concentrations that mostly blocked P-type Ca^{2+} channels ($10\text{--}30 \text{ nM}$). However, when $\omega\text{-AgTx-TK}$ concentration was increased to 50 nM , the effects of baclofen on PPF were significantly reduced. At 400 nM , $\omega\text{-AgTx-TK}$ virtually occluded all baclofen's effects. Since these concentrations of $\omega\text{-AgTx-TK}$ block a fraction of Q-type Ca^{2+} channels, it is therefore concluded that Q-type Ca^{2+} channels are the ones involved in the modulatory action of baclofen.

Q-type Ca^{2+} channels also mediate presynaptic inhibition of corticostriatal glutamatergic afferents by muscarinic receptor agonists [4]. It is therefore hypothesized that Q-type Ca^{2+} channels in neostriatal glutamatergic terminals may be the 'final pathway' for presynaptic modulation produced by different transmitters.



Baclofen action in the presence of Ca^{2+} channel antagonists. Second bar shows that in the presence of $1 \mu M$ ω -CgTx (blockage of N-type Ca^{2+} channels), the action of baclofen is similar to the control (leftmost bar). The same is true in the presence of $20 nM$ ω -AgTx-TK (3rd bar, blockage of P-type Ca^{2+} channels). However, in the presence of 50 – $400 nM$ ω -AgTx-TK (blockage of P- and Q-type Ca^{2+} channels), the PPF enhancement elicited by $2 \mu M$ baclofen was reduced significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.006$, respectively; Mann–Whitney's *U*-test). The action of ω -AgTx-TK is concentration dependent.

The authors are grateful to M.C. Vilchis for her technical assistance. J. Barral was a fellow of PASPA-DGAPA-UNAM and S. Toro was a fellow of Fundaci3n UNAM. This work was supported in part by DGAPA-UNAM grants 597 and IN201397 to J. Barral and E.G., respectively, and CONACyT grants: 31839-N and 25812-N to J. Barral and E.G., respectively.

W. J. and Stanfield, P.R., Ion Channels, Molecules in Action, Cambridge University Press, Cambridge, 1996.

W. J., A., Wilhelm, A. and Stimm, T., Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.*, 126 (1999) 1831–1839.

Bargas, J., Ayala, G.X., Hernandez, E. and Galarraga, E., Ca^{2+} channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res. Bull.*, 45 (1998) 521–524.

Barral, J., Galarraga, E. and Bargas, J., Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels. *Brain Res. Bull.*, 49 (1999) 265–289.

Brundage, J.M. and Dunwiddie, T.V., Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from

single hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 15 (1996) 5603–5612.

- [6] Calabresi, P., Mercuri, N.B. and Bernardi, G., Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog. Brain Res.*, 99 (1993) 299–308.
- [7] Creager, R., Dunwiddie, T. and Lynch, G., Paired pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)*, 299 (1988) 409–424.
- [8] Dunwiddie, T.V. and Hass, H.L., Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J. Physiol.*, 369 (1985) 365–377.
- [9] Dutar, P. and Nicoll, R., GABA_B receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the hippocampus: pharmacology and intracellular mechanisms. In T.V. Dunwiddie and D.M. Lovinger (Eds.), *Presynaptic Receptors In The Mammalian Brain*, Birkhauser, Boston, 1993, pp. 14–26.
- [10] Hernandez-Echeagaray, E., Galarraga, E. and Bargas, J., 3- α -chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology*, 37 (1998) 1493–1502.
- [11] Kahle, J.S. and Cotman, C.W., Adenosine, L-AP4, and baclofen modulation of paired pulse facilitation in the dentate gyrus: interstimulus interval dependent pharmacology. *Exp. Brain Res.*, 94 (1993) 97–104.
- [12] Mermelstein, P.G., Foehring, R.C., Tkatch, T., Song, W.J., Baranaukas, G. and Surmeier, D.J., Properties of Q-type channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with β subunit expression. *J. Neurosci.*, 19 (1999) 7268–7277.
- [13] Misgeld, U., Bijak, M. and Jarolimek, W., A physiological role for GABA_B receptors and the effects of the baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 46 (1995) 423–462.
- [14] Nisenbaum, E.S., Berger, T.W. and Grace, A.A., Presynaptic modulation by GABA_B receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.*, 67 (1992) 477–481.
- [15] Nisenbaum, E.S., Berger, T.W. and Grace, A.A., Depression of glutamatergic and GABAergic synaptic responses in striatal spiny neurons by stimulation of presynaptic GABA_B receptors. *Synapse*, 14 (1993) 221–242.
- [16] Sullivan, J.M., Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 82 (1999) 1286–1294.
- [17] Teramoto, T., Nidome, T., Miyagawa, T., Nishisawa, Y., Katayama, K. and Sawada, K., Two types of calcium channels sensitive to ω -agatoxin-TK in cultured rat hippocampal neurons. *NeuroReport*, 6 (1995) 1684–1688.
- [18] Wu, L.G. and Saggau, P., Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci.*, 20 (1997) 204–212.
- [19] Zucker, R.S., Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 12 (1989) 13–31.
- [20] Zucker, R.S., Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 19 (1999) 305–313.

Discusión General

En términos generales, el presente trabajo muestra que la activación de receptores presinápticos para diversos neuromoduladores produce inhibición presináptica. La activación de estos receptores, por medio de proteínas-G, produce el bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo Q en la terminal sináptica, lo cual disminuye la liberación de glutamato en la sinapsis cortico-estriatal.

En la primera parte de este trabajo mostramos como el paradigma experimental de PPF combinado con experimentos de oclusión farmacológica es la técnica más adecuada para estudiar la modulación en la liberación de neurotransmisor que ocurren en las terminales presinápticas.

Nuestros resultados muestran que las manipulaciones en la concentración de Ca^{2+} extracelular o el bloqueo total o parcial de las diversas conduc-

tancias de Ca^{2+} produce una disminución en la liberación de neurotransmisor, que se refleja como un incremento en la facilitación confirmando la hipótesis de Ca^{2+} residual [95, 96, 97, 98]. De tal modo que los cambios en la relación de las respuestas S_2 y S_1 , constituye uno de los mejores indicadores de eventos presinápticos [49, 39, 50, 213, 14, 185, 186, 206, 4, 57, 178, 109, 40, 75, 76].

Los resultados mostrados en este trabajo, así como otros del propio laboratorio [11] indican que los canales de Ca^{2+} N y Q, parecen estar actuando en la zona activa de la sinapsis, muy cerca de los sitios de liberación. Mientras que los canales de Ca^{2+} tipo L, parecen estar presentes en las terminales nerviosas sin que su bloqueo afecte la liberación [11], sin embargo su activación produce depresión cuando se utiliza el protocolo experimental de pulso pareado,

lo que sugiere que dichos canales están presentes en la terminal pero alejados de los sitios de liberación. Estos resultados confirman que en el neoestriado [11], como en otros sistemas [210], que los canales de Ca^{2+} que poseen las subunidades α_{1a} y α_{1b} son responsables de la liberación de glutamato. Adicionalmente observamos que los canales de Ca^{2+} tipo L también participan en la liberación de neurotransmisor.

La curva dosis respuesta obtenida al bloquear de manera inespecífica los canales de Ca^{2+} con Cd^{2+} da un coeficiente de Hill cercano a 1.0. Lo que sugiere que la inhibición presináptica producida por el bloqueo de los canales de Ca^{2+} no distingue entre los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} durante la liberación. Previamente se había demostrado que los canales que participan en la liberación de glutamato en la sinapsis cortico-estriatal son los canales N y P/Q, pero no los tipo L [11]. Por lo que, si

el bloqueo con cadmio indica la participación de los canales de Ca^{2+} , uno de ellos es el tipo N, ya que observamos un componente sensible a la ω -CgTx GVIA. Otra conductancia de Ca^{2+} participante es la de los canales P/Q. En ese sentido, la conductancia de calcio más importante en la liberación resulta ser la sensible a ω -AgTx TK. Por ello se decidió hacer la curva dosis respuesta a la ω -AgTx TK, en este caso si observamos un coeficiente de Hill cercano a 1 nos indicaría la participación de sólo un canal de Ca^{2+} , mientras que un número mayor indicaría la participación de ambos canales. Los datos obtenidos mostraron la participación de solo un canal que es sensible a altas concentraciones de la ω -AgTx TK, mismo que se ajusta al perfil farmacológico del canal Q.

Por otro lado, el hecho de que el bloqueo del canal L no influya en la liberación de glutamato, no quiere decir que

no está presente en la terminal. Para ello decidimos utilizar el BayK 8644 con el fin de activar el canal L, de tal modo que si ocurría un cambio en la PPF nos indicaría su presencia en las terminales cortico-estriatales. Los datos mostraron un decremento importante en la PPF lo que indica que la activación de estos canales provoca la entrada de Ca^{2+} a la terminal, de forma similar a lo observado cuando se incrementa la concentración extracelular de Ca^{2+} .

Los canales L pudieran estar participando de manera indirecta en la liberación incrementando la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que ayudaría a depolarizar la terminal después de la llegada del estímulo. Otra posibilidad es que la entrada de Ca^{2+} al interior de la terminal este activando los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , como retículo endoplásmico liso, a través de la activación de receptores a rianodina. De tal modo que la activación de los canales

de Ca^{2+} produciría un incremento importante en la concentración intracelular de este catión en la terminal por la entrada de Ca^{2+} extracelular y por la liberación intracelular de Ca^{2+} . Ambos eventos no son excluyentes y pudieran estar ocurriendo de manera simultánea.

Una vez establecido el papel que cada uno de los canales de Ca^{2+} tiene en la terminales glutamatérgicas. Nos interesaba saber si agonistas de los diferentes neurotransmisores y neuromodulares propios del neocórtico podían producir inhibición presináptica, y si ésta se lleva a cabo a través de canales de Ca^{2+} .

Como ya se mencionó dos de los neurotransmisores más importantes en la función de los ganglios basales son la acetilcolina y el GABA [6, 205]. Ambos tienen efectos presinápticos [203, 53] y postsinápticos [157, 138]. Asimismo, se sabe que regulan la liberación de glutamato, actuando como neuromodula-

dores [83, 47, 146, 147], por la activación de receptores presinápticos metabotrópicos [74, 121, 146, 147, 142]

De acuerdo a nuestros datos, en la zona activa de la sinapsis corticoes-triatal los canales de Ca^{2+} presentes son tipos N y Q. En ese sentido la activación de receptores metabotrópicos tanto colinérgicos como GABAérgicos produjo un incremento muy importante en la PPF; para el caso de la modulación GABAérgica fue muy elevada (> 450%). Mientras que la modulación producida por la activación de receptores muscarínicos fue casi la mitad de la producida por GABA (\cong 250%), que es similar a lo observado en esta preparación con otras técnicas [76]. Estos datos podrían indicar que la densidad de receptores $GABA_B$ sea casi el doble con respecto a los muscarínicos, otra posibilidad que la modulación que ejercen los receptores GABAérgicos sea mayor a la producida por los muscarínicos

Resulta interesante el hecho de que la activación de las propias neuronas GABAérgicas estimuladas por la liberación de glutamato regulen la liberación de éste en la sinapsis corticoes-triatal. Esto sugiere que esta modulación regula la entrada de información desde la corteza hacia el circuito de los ganglios basales.

Un aspecto que nos llamó la atención es que las concentraciones utilizadas con agonistas muscarínicos para observar inhibición presináptica están en el rango submicromolar o nanomolar [28, 84, 15, 16], mientras que para receptores postsinápticos se requieren concentraciones mucho mayores (micromolares). En el laboratorio observamos la inhibición presináptica producida por la muscarina a las concentraciones más bajas reportadas, tanto con técnicas de registro extracelular (en este trabajo) como intracelular [76], mientras que a concentraciones mayores tiene impor-

tantes consecuencias postsinápticas [157, 62]. Es importante saber que existe una diferencia logarítmica en la concentración del agonista muscarínico que permite separar acciones presinápticas de las postsinápticas, lo que indica la alta afinidad de los receptores muscarínicos presinápticos con respecto a los postsinápticos.

Quizás el papel que desempeñan los receptores muscarínicos presinápticos sea en primer término el de regular la entrada aferente al circuito de los ganglios basales. En ese sentido, si la liberación de acetilcolina es mayor, entonces actúa sobre las neuronas de proyección, regulando su disparo.

Por otro lado se exploró la participación presináptica de receptores nicotínicos, sin embargo los resultados obtenidos no mostraron que la activación de estos receptores produzca modulación presináptica en la sinapsis cortico-estriatal

Los resultados obtenidos al estudiar la inhibición presináptica producida por la activación de receptores GABA_B fueron similares a lo observado al activar receptores muscarínicos, ya que ambos agonistas producen un incremento importante en la PPF, y los experimentos de oclusión farmacológica indican que la modulación ocurre sobre el canal de Ca²⁺ tipo Q

Tomados en su conjunto, los datos presentados en el presente trabajo sugieren que la modulación presináptica de las aferentes corticales que llegan al neocórtex, se debe a que la activación de auto- y heterorreceptores presinápticos actúa principalmente sobre canales de Ca²⁺ de tipo Q. Sin embargo, nuestro trabajo no excluye la posibilidad de que existan otros mecanismos de modulación presináptica, como es el caso de la activación de conductancias de potasio, o mecanismos de regulación en la maquinaria de liberación [135, 119]

El papel de la inhibición presináptica se basa en la posibilidad de un control selectivo de la entrada a células que reciben múltiples entradas de diversos orígenes ^[189], de tal modo que cierto tipo de entrada se vea favorecida sobre las demás, cuando recibe la estimulación apropiada. Esto implica necesariamente que las redes neuronales deban utilizar mecanismos de control independiente que actué sobre entradas convergentes, las cuales tienen un origen independiente tanto de la entrada como de la salida ^[189]. En ese sentido, la principal entrada de los ganglios basales proviene de la corteza cerebral ^[126, 140, 173, 205]. Es bien conocido que cuando las neuronas espinosas medianas son registradas *in vivo*, se genera una actividad espontánea caracterizada por periodos de silencio seguidos por breves episodios de disparo repetitivo ^[205]. Esto se ha correlacionado con el aprendizaje motor ^[79, 105, 31] de mamíferos y otros vertebrados

^[54, 102, 192]. En esos periodos el potencial de la membrana presenta un comportamiento biestable ya que fluctúa entre dos estados subumbrales, uno hiperpolarizado o silente, y otro depolarizado ^[201]. Sin embargo, esta biestabilidad no parece deberse a la sumación temporal de potenciales postsinápticos excitatorios ^[82, 169], sino a la activación de corrientes entrantes sostenidas. Asimismo, pueden ser activados o terminados por breves entradas sinápticas ^[9, 82, 164]. Quizás sea la modulación de las propiedades intrínsecas de la membrana por neuromoduladores la que provea a las neuronas de la flexibilidad necesaria para activar las propiedades biestables. Como la entrada cortical puede interactuar con todos los elementos del neocórtex, las vías que en un momento dado son activadas en la corteza, pudieran incidir sobre neuronas que producen inhibición presináptica, ejerciendo su influencia sobre determinadas vías ner-

viosas [26, 185, 186]. Es posible entonces que muchas aferencias que llegan al neocórtex, se vean favorecidas por su selectividad a un neurotransmisor en sus terminales promoviendo las propiedades bistables. La modulación que los diferentes neurotransmisores ejercen en las terminales corticales al neocórtex podría estar generando cambios en la circuitería neuronal de forma dinámica, por los efectos que producen en la presinapsis. Siendo este mecanismo independiente de la inhibición postsináptica que estos mismos neurotransmisores pudieran ejercer en las neuronas de proyección [189].

En ese orden de ideas, la modulación presináptica observada en las terminales glutamatérgicas que llegan al neocórtex provenientes de la corteza, también modulan postsinápticamente a las neuronas de proyección [62, 138, 142, 145, 145, 157], sin embargo la sensibilidad de los receptores presinápticos es ma-

yor a la observada en las células postsinápticas [76, 62]. Los heterorreceptores presinápticos de las terminales glutamatérgicas que llegan al neocórtex, son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas-G, por lo que su activación desencadena diferentes vías de señalización, que actúan poco después de la liberación del neurotransmisor. Mientras que los receptores postsinápticos pueden ser ionotrópicos y metabotrópicos [74, 145, 146, 147].

Este estudio se ha centrado en la modulación que diversos moduladores y neurotransmisores, propios de los ganglios basales, realizan sobre la entrada cortical. Como ya se mencionó, principalmente se establecen sinapsis con las neuronas GABAérgicas de proyección, asimismo se establecen conexiones sinápticas con las interneuronas (colinérgicas, GABAérgicas, etc.) y con otras aferentes. Este estudio revela que la acción moduladora que ejercen algu-

nos de los neurotransmisores propios del neostriado ocurre al bloquear conductancias de calcio tipo Q, sin que al parecer las otras conductancias participantes se vean influenciadas. Esto llama poderosamente la atención pues la modulación presináptica, al menos en este sistema, disminuye la cantidad de neurotransmisor liberado, por lo que las otras entradas corticales que no sean moduladas, en un momento dado, se verán favorecidas con respecto a las que si lo estén.

La activación de receptores presinápticos en las terminales glutamatergicas corticoestriatales es muy importante, pues permite que diversos elementos del neostriado regulen la información que están recibiendo las neuronas de proyección, y de este modo, la regulación de la actividad motora a través de los núcleos de salida de los ganglios basales. Esto quiere decir que los elementos neuronales de los ganglios

basales pudieran estar seleccionando a los grupos de fibras corticales que los están activando, y de este modo regular la actividad de sus neuronas de proyección.

La modulación de la transmisión sináptica mediada por canales de calcio dependientes de voltaje es uno de los mecanismos principales para explicar como la transmisión sináptica es controlada [135, 119]. Ya que la relación entre la entrada de calcio y la liberación de neurotransmisor es muy sensible a pequeños cambios en la concentración intracelular de calcio. De tal modo que modestos cambios en las corrientes de calcio en las terminales nerviosas, podrían producir efectos significativos en la transmisión sináptica.

Los datos mostrados en este trabajo, indican que mientras algunos canales contribuyen a la depolarización de la terminal (canales L), otros canales son los encargados de producir la libe-

ración de neurotransmisor (Canales N y Q). Sin embargo, sólo uno de ellos (canales Q) fue susceptible de ser modulado. Esto no quiere decir, que estos canales no realicen otras funciones. Se sabe, por ejemplo, que la entrada de calcio por los canales L puede activar receptores de rianodina, y de este modo promover la liberación de calcio de los depósitos intracelulares de calcio [156]. Asimismo, se ha observado que los canales de calcio de tipo N también son susceptibles de ser modulados [210]. Por lo que es necesario realizar más estudios acerca del papel de los diferentes canales de calcio en la transmisión sináptica

Por último, sería interesante saber si la contribución de cada uno de los canales de calcio ha sido similar a lo largo de la evolución. De tal modo que si conocemos como y bajo que condiciones, se originaron los diferentes tipos de canales de calcio, sería posible

comprender como la existencia de las múltiples vías modulatorias cooperan para regular la función sináptica, y finalmente la conducta animal.

Conclusiones Generales

- * Las aferentes corticales que llegan al neocóstriado de la rata liberan glutamato. Poseen receptores a diferentes neurotransmisores y neuromoduladores, los cuales al ser activados modulan la cantidad de transmisor que es liberado al espacio sináptico.
- * El calcio extracelular es fundamental para la liberación de neurotransmisor. Cambios en la concentración extracelular de este catión, así como el bloqueo de los diversos canales de calcio, producen inhibición presináptica.
- * Los canales de calcio presentes en las aferentes terminales de las aferentes corticales que llegan al neocóstriado son los canales L, N y Q.
- * Los canales de calcio que participan directamente en el proceso de liberación son los canales N y Q.
- * La activación de receptores colinérgicos muscarínicos produjo inhibición presináptica, a través de la regulación de canales de calcio tipo Q.
- * La activación de receptores GABA_B en la sinapsis cortico-estriatal, produjo inhibición presináptica, a través de la modulación de canales de calcio de tipo Q.
- * Los datos sugieren que a pesar de que existen varios canales de calcio en las terminales corticales que llegan al neocóstriado (L, N y Q), sólo los canales de calcio de tipo Q participan en la modulación presináptica de estas aferentes.
- * Sin embargo no se puede descartar el hecho de que pueden existir otros mecanismos, además de los descritos en este trabajo, en los cuales la activación de receptores presinápticos produzca inhibición presináptica.

Literatura Citada

- 1.- Aidley D J y P R Stanfield (1996) Ion channels, molecules in action. Cambridge University Press, Cambridge, pp 168-170.
- 2.- Aldrich R W , P A. Getting y S H. Thompson (1979) Mechanism of frequency-dependent broadening of molluscan neurone soma spikes J Physiol 291:531-544
- 3.- Aldridge J W y S Gilman (1991) The temporal structure of spike trains in the primate basal ganglia: Afferent regulation of bursting demonstrated with precentral cortical ablations. Brain Res. 543 123-138
- 4.- Andreassen, M S y J.J. Hablitz (1995) Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus. A patch-clamp study in rat hippocampus in vitro J Neurosci. 72 326-336
- 5.- Andrew R.D y F E. Dudek (1985) Spike broadening in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamic slices Brain Res 334 176-179
- 6.- Arbib, M , P Érdi y J. Szentágothai (1998) Neural Organization, structure function y dynamics MIT Press Cambridge pp 303-328
- 7.- Bajjalieh S.M. (1999) Synaptic vesicle docking and fusion Curr Opin. Neurobiol. 9 321-328
- 8.- Bargas J y E Galarraga (1995) Firing response modulation in neostriatal projection neurons by cholinergic and dopaminergic agonists En Ariano M.A. y D J Surmeier (Eds) Molecular and cellular mechanisms of neostriatal neurons Landes Press USA pp 183-191
- 9.- Bargas, J, Galarraga, E, y Aceves, J. (1991) Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. Brain res 539: 159-163
- 10.- Bargas J, E. Galarraga y J Aceves (1998a) Los ganglios basales En Fisiología, células, órganos y sistemas Vol 5 Cap X 13 Muñoz, E.J. y X Garcia (Eds) FCE México. pp 257-273
- 11.- Bargas, J., G X Ayala, E. Hernández y E Galarraga (1998b) Ca²⁺-Channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. Brain Res Bull 45 521-524
- 12.- Bargas, J, A Howe, J Eberwine, Y Cao, y D J Surmeier (1994) Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated adult rat neostriatal neurons J. Neurosci 14 6667-6686
- 13.- Barret E E y C F Stevens (1972) The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction J Physiol. 227:691-708
- 14.- Baskis B.A y R C Malenka (1981) Agonist at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal J. Physiol 444.687-701
- 15.- Bellingham M C y A J Berger (1995) Presynaptic depression of glutamatergic EPSCs in rat hypoglossal motoneurons (HMs) by muscarinic receptors is not due to inhibition of N- or P-type calcium currents. Soc Neurosci Abstr 21 925
- 16.- Bellingham, M C y A J Berger. (1996) Presynaptic depression of excitatory synaptic inputs to rat hypoglossal motoneurons by muscarinic M2 receptors J. Neurophysiol 76(6) 3758-3770.
- 17.- Birnbaumer L., N Qin, R Olcese, E Tarelius, D Platano, J Constantin y E Stefani (1998) Structures and functions of calcium channel β subunits J. Bioenergetics and Biomembranes 30 357-375.
- 18.- Bittner G D y D A Baxter (1983) Intracellular recordings from synaptic terminals during facilitation of transmitter release Soc Neurosci Abstr 9 883
- 19.- Blaustein, M P (1988) Calcium transport and buffering in neurons TINS 10 438-443
- 20.- Bonner T I (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity TINS 12:148-151
- 21.- Bounnet E, T W Soong, K Sutton, S Slaymaker, E Mathews, A Montell, G.W Zamponi, J Nargeot y T P Snutch (1999) Splicing of α_{1A} subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels Nature Neuroscience 2.407-415.
- 22.- Bowery N.G. (1993) GABA_B receptor pharmacology Ann Rev. Pharmacol Toxicol 33 109-147
- 23.- Brodal, P (1992) The central Nervous system Structure and function. Oxford University Press N Y pp 246-261
- 24.- Burgoyne R D y A Morgan (1995) Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics TINS 18.191-196

- 25.- Burgoyne R.D. y A. Morgan (1998) Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 24:367-376.
- 26.- Burke, R. y Rudomin, P (1977) Spinal neurons and synapses in *Handbook of Physiology. The Nervous System. Am. Physiol Soc Bethesda MD. Vol. 1 pp 877-944.*
- 27.- Calabresi, P.; N.B. Mercury, M De-Murtas y G. Bernardi (1990) Endogenous GABA mediates presynaptic inhibition of spontaneous and evoked excitatory synaptic potentials in the rat neostriatum *Neurosci Lett.* 118 99-102.
- 28.- Calabresi, P., N.E. Mercuri, y G. Bernardi, (1993a) Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog Brain Res.* 99. 299-308
- 29.- Calabresi, P., Pisani, A, Mercuri, N.B y Bernardi, G (1993b) Heterogeneity of metabotropic glutamate receptors in the striatum: Electrophysiological evidence *Eur J. Neurosci.* 5(10): 1370-1377
- 30.- Catterall, W.A (1998) Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24:307-323.
- 31.- Cepeda, C., Waish, J.P, Peacock, W, Buchwald, N.A, y Levine, M.S. (1994) Neurophysiological, pharmacological and morphological properties of human caudate neurons recorded in vitro. *Neurosci* 59: 89-103
- 32.- Chan K.Y.; K.S. Leung y W Yung (1998) Differential expression of pre- and postsynaptic GABA_B receptors in rat *substantia nigra pars reticulata* neurones. *Eur. J. Pharmacol* 349 187-197
- 33.- Cnarlton M.P S.J. Smith y R.S Zucker (1982) Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse *J. Physiol* 323:173-193.
- 34.- Chen G y A.N. van-den-Pol (1998) Presynaptic GABA_B autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channel and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons *J Neurosci* 18(5) 1913-1922.
- 35.- Cherubini, P., P.L. Herring; L. Lanfumey y P Stanzione (1988) Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones in vitro *J Physiol* 400 677-690
- 36.- Chuang H.H., Y.N. Jan y L.Y. Jan (1997) Regulation of IRK3 inward rectifier K⁺ channel by M1 acetylcholine receptors and intracellular magnesium *Cell* 89: 1121-1132
- 37.- Consolo S, H Ladinsky, R Vinci, E. Palazzi y J Wang (1987) An in vivo pharmacological study on muscarinic receptor subtypes regulating cholinergic neurotransmission in rat striatum *Biochem Pharmacol* 36:3075-3077
- 38.- Cordingley, G.E y F.F. Weight. (1986) Non-cholinergic synaptic excitation in neostriatum: pharmacological evidence for mediation by glutamate-like transmitter *Br J Pharmacol* 88: 847-856
- 39.- Creager R., T Dunwiddie y G. Lynch (1980) Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the *in vitro* rat hippocampus. *J. Physiol.* 299.409-424
- 40.- Debanne, D. M.C Guérineau, B.H Gahwiler y S.M Thompson (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release *J Physiol Lond* 491.163-176
- 41.- De-Boer, P y Westernik, B.H (1994) GABAergic modulation of striatal cholinergic interneurons an in vivo microdialysis study *J Neurochem* 62(1): 70-75
- 42.- Del-Castillo, J. y B Katz (1954a) Quantal components of the end-plate potential *J Physiol* 124 560-573
- 43.- Del-Castillo, J y B. Katz (1954b) Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression *J. Physiol* 124 574-585
- 44.- Di-Chiara G y M. Morelli (1993) Dopamine acetylcholine interactions in the striatum *A Working hypothesis Adv Neurol* 60:102-106
- 45.- Di-Figlia, M y N Aronin (1982) Ultrastructural features of immunoreactive somatostatin neurons in the rat caudate nucleus *J Neurosci* 2:1267-1274
- 46.- Dodge, F.A y R Rahamimoff (1967) Cooperative actions of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction *J Physiol.* 193 419-432.
- 47.- Dodt H.U y U Misgeld (1986) Muscarinic slow excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum *J Physiol* 380 593-608
- 48.- Dunlap K, J.I Luebke y T.J Turner (1995) Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons *TINS* 18(2) 89-98
- 49.- Dunwiddie T.V y G Lynch (1978) Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus

- Localization and frequency dependency. *J Physiol* 276: 353-367
- 50.- Dunwiddie, T.V. y H.L. Hass. (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action *J Physiol*. 369 365-377
- 51 - Dutar P. y R.A. Nicoll (1988a) A physiological role for GABA_A receptors in the central nervous system *Nature* 332: 156-158.
- 52.- Dutar P. y R.A. Nicholl (1988b) Pre- and postsynaptic GABA_A receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1 585-591.
- 53 - Dutar, P y R. Nicoll (1993) GABA_A receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the hippocampus: Pharmacology and intracellular Mechanisms. *En* Dunwiddie, T.V. y D.M. Lovinger. (Eds) Presynaptic receptors in the mammalian brain Birkhäuser, Boston pp 14-26
- 54 - Eken T. y O Kiehn (1989) Bistable firing properties of soleus motor units in unrestrained rats *Acta Physiol. Scand* 136. 383-394.
- 55.- Elliot, L.S., E.R. Kandel, S.A. Siegelbaum, H. Blumenfeld (1993) Imaging terminals of Aplysia sensory neurons demonstrates role of enhanced Ca influx in presynaptic facilitation. *Nature* 316 634-37
- 56 - Fisher, R.S., N.A. Bushwaid; C.D. Hull y M.S. Levine (1986) The GABAergic striatonigral neurons of the cat: Demonstration by double peroxidase labeling *Brain Res* 398 148-156
- 57.- Fiedorovich I.A. y M.J. Gutnick (1995) Paired-pulse facilitation of IPSC in slices of immature and mature mouse somatosensory neocortex *J. Neurophysiol* 73 2591-2595
- 58 - Flores-Hernández, J., Galarraga, E., y Bargas, J (1997) Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse*. 25: 185-195
- 59 - Foehring, R.C.; P.G. Mermelstein, W. Song, S. Ulrich y J. Surmeier. (2000) Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons *J Neurophysiol*. 84: 2225-2236.
- 60 - Gage, P.W. (1992) Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA *TINS* 15 46-51.
- 61 - Galarraga, E., S. Hernández-López, A. Reyes; J. Barral y J. Bargas (1997) Dopamine facilitates striatal EPSP's through an L-type Ca²⁺ conductance. *Neuroreport* 8: 1283-1286
- 62 - Galarraga E., S. Hernández-López, A. Reyes, I. Miranda, F. Bermudez-Rattoni, C. Vilchis y J. Bargas (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: A functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci*. 19:3629-3638
- 63 - Graham, B. y S. Redman (1994). A stimulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition. *J Neurophysiol*. 71: 538-549
- 64.- Graybiel, A.M. (1990a). The basal ganglia and the initiation of the movement. *Rev Neurol. (Paris)* 146:570-574.
- 65 - Graybiel, A.M. (1990b) Neurotransmitters and neuromodulation in the basal ganglia *TINS* 13: 244-253.
- 66.- Guzman, J.N.; J.A. Laville, R. Vergara; E. Galarraga y J. Bargas (2000) Evidencia de inhibición colateral recíproca entre neuronas espinosas medianas del neostriado. XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas y XLIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Cancún Q. Roo, México. (REF O25)
- 67.- Hamm, E. y A. Gilchrist (1996) Heterotrimeric G proteins *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 189-196
- 68.- Hammond C (1996) Cellular and molecular neurobiology Academic Press N.Y. pp 188-214
- 69 - Hanson, P.I. J.E. Heuser y R. Jahn (1997) Neurotransmitter release-four years of SNARE complexes *Curr. Opin. Neurol* 7:310-215
- 70 - Harsing L.G. y M.J. Zigmond (1998) Postsynaptic integration of cholinergic and dopaminergic signals on medium-sized GABAergic projection neurons in the neostriatum *Brain res Bull.* 45:607-613
- 71 - Heimer L., L. Zaborszky, D.S. Zahm, y G.F. Alheid. (1987) The ventral striatopallidothalamic projection. I The striatopallidal link originating in the striatal parts of the olfactory tubercle *J Comp Neurol*. 22.255(4):571-91.
- 72 - Herch S.M. y A.I. Levey (1995) Immunocytochemical localization of M1-M4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in the striatum *En* Ariano M.A. y D.J. Surmeier (Eds) Molecular and cellular mechanisms of neostriatal neurons Landes Press USA. pp 35-44

- 73.- Herlitz, S Garcia, D.E Mackie, K Hille, B Scheuer, T. y Catterall, W A (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein subunits Nature 280 258-262.
- 74 - Hernández-Echeagaray, E. (1998) la modulación colinérgica de las aferentes glutamatérgicas el estriado Tesis de Doctorado. UNAM-UACPyP, México. Pag 5
- 75 - Hernández-Echeagaray, E., J. Bargas, y E Galarraga (1996) Cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents to the neostriatum as seen with paired pulse facilitation and 4-AP induced release. Neurosci Abs 22 410
- 76.- Hernández-Echeagaray, E, E Galarraga y J Bargas (1998) 3- α -chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum Neuropharmacol. 37 1493-1502
- 77.- Hersch S M, C. Gutekunst, H.D. Rees, C J. Heilman, y A I Levey (1994) Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies J Neurosci 14:3351-3363.
- 78 - Hescheler J y G. Schultz (1993) G-Proteins involved in the calcium channel signaling system Curr. Opin Neurobiol 3 360-367
- 79 - Hikosaka O., M Sakamoto y S Usui (1989) Functional properties of monkey caudate neurons I Activities relates to saccadic eye movement J Neurophysiol 61: 780-798
- 80 - Hill M.P. y J.M. Brotchie (1999) Control of glutamate release by calcium channels and kappa-opioid receptors in rodent and primate striatum Br J. Pharmacol. 127. 275-283
- 81.- Hirata K, T Ohno-Shosaku, S. Sawada y C Yamamoto (1995) Baclofen inhibits GABAergic transmission after treatment with type-specific calcium channel blockers in cultured rat hippocampal neurons. Neurosci Lett. 187 205-208.
- 82 - Hounsgaard J, H Hultborn, B Jespersen y O Kiehn (1988) Bistability of α -motoneurons in the decerebrate cat and acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan J Physiol (Lond) 405: 345-367
- 83 - Howe A.R y D.J Sumner (1995) Muscarinic receptor modulate N-, P-, and L-type calcium currents in rat striatal neurons through parallel pathways. J Neurosci 15: 458-469
- 84 - Hsu, K.S, C.C Huang y P.W Gean (1995) Muscarinic depression of synaptic transmission mediated by the presynaptic M_3 receptor in the rat neostriatum Neurosci Lett 197 141-144
- 85 - Hsu K.S, C.H Yang, C.C. Huang, y P.W Gean (1996) Carbachol induces inward current in neostriatal neurons through M_1 -Like muscarinic receptors Neuroscience 73 751-760
- 86.- Jarolimek, W y U. Misgeld (1997) GABA_B receptor-mediated inhibition of tetrodotoxin-resistant GABA release in rodent hippocampal CA1 pyramidal cells J Neurosci 17(3) 1025-1032
- 87 - Jiang, Z.G y North, R.A. (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro J Physiol. Lond. 443 533-553
- 88 - Johnston, D y Wu, S.M. (1995) Foundations of cellular neurobiology MIT Press Cambridge Mass pp 287-391
- 89.- Kahle J.S y C.W Cotman (1993) Adenosine, L-AP4, and baclofen modulation of paired pulse potentiation in Dentate Gyrus Interstimulus interval-dependent pharmacology Exp Brain Res 94(1) 97-104
- 90 - Kamatchi L.G y K.M Ticku (1990) Functional coupling of presynaptic GABA_B receptors with voltage-gated calcium channel regulation by protein kinases A and C in cultured spinal cord neurons. Mol Pharmacol. 38 342-347
- 91 - Kamiya, H. y R.S Zucker (1994) Residual Ca^{2+} and short-term plasticity Nature 371 603-606
- 92 - Kandel, E.R, Schwartz, J.H y Jessell, T.M (2000) Principles of Neural Science. 4a Ed McGraw-Hill USA pp 175-298.
- 93 - Katz, B (1966) Nerve, muscle and synapsis. McGraw-Hill N.Y, pp.97-110
- 94.- Katz, B (1969) The release of neural transmitter substances Springfield IL Thomas Pag 1
- 95.- Katz, B y Miledi, R. (1967a) The release of acetylcholine from nerve endings by graded electrical pulses Proc R. Soc Lond. B 167 23-38
- 96 - Katz, B y R Miledi (1967b) The timing of calcium action during neuromuscular transmission J Physiol (London) 203 459-467

- 107.- Katz, B y R Miledi (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation J Physiol 195 481-492
- 108.- Katz, B y R Miledi (1970) Further study of the role of calcium in synaptic transmission J Physiol (London) 207: 789-801
- 109.- Kaupmann K, K Huggel, J Heid; J Flor, S. Bischoff, J Mickel; G. McMster; C Angst, H Bittiger, W. Froesti y B. Bettler (1997) Expression cloning GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors Nature 386: 239-246
- 110.- Kawaguchi Y (1992) Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents J Neurophysiol 67 1669-1682.
- 111.- Kawaguchi, T. (1993) Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. J Neurosci 13 4908-4923
- 112.- Keihn O (1991) Plateau potentials and active integration in the "Final common pathway" for motor behaviour. TINS 14 68-73
- 113.- Kemp, J M y Powell, T.P S (1971a) The synaptic organization of the caudate nucleus Phil Tras R Soc B262: 403-412
- 114.- Kemp, J M y Powell, T P S (1971b) The site of termination of afferent fibers in the caudate nucleus Phil Tras R. Soc B262 413-427.
- 115.- Kim Y.I. y F E. Dudek (1992) Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: Inhibitory synaptic mechanisms J Physiol (Lond) 458. 247-260
- 116.- Kimura, M, M Kato y H. Shimazaki (1990) Physiological properties of projection neurons in the monkey striatum to globus Pallidum Exp Brain Res 82:672-676
- 117.- Kita, H (1993) The GABAergic circuits of the striatum. Prog. Brain Res. 99:51-72
- 118.- Kita, H y ST Kitai (1988) Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in cat neostriatum: Their morphological types and populations. Brain Res 447.346-352
- 119.- Kobayashi K, T Sakaba y M Tachibana (1995) Potentiation of Ca²⁺ transients in the presynaptic terminals of gold fish retinal bipolar cells J Physiol 482 7-13
- 120.- Kombian S B A J Zidishouski y Q.J Pittman (1996) GABA_B receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus *in vitro*. J. Neurophysiol. 76 1166-1179
- 121.- Landis, D M D., A K Hall, L.A Weinstein y T.S Reese (1998). The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse Neuron 1.201-209
- 122.- Lehericy, S, E.C. Hirsch, P Cervera, L B Hersh, J J Hauw, M Rubberg y Y Agid (1989) Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum, of patients with Alzheimer disease Proc. Natl. Acad Sci 85580-85584
- 123.- Levitan, I B (1994) Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation Ann. Rev. Physiol. 56 193-212.
- 124.- Loffholz K (1996) Muscarinic receptors and cell signaling Prog. Brain Res 109 191-199)
- 125.- López H S. y A M Brown (1992) Neuro-modulation Curr Opin. Neurobiol 2:317-322
- 126.- Lovinger, D M y E. Tyler (1996) Synaptic transmission and modulation in the neostriatum Int Rev. Neurobiol 39 77-111
- 127.- Lovinger, D M, Merritt, A y Reyes, D (1994) Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses Neurosci. 62 31-40
- 128.- Lovinger, D M, Tyler, E, Fidler, S y Merritt, A (1993) Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. J. Neurophysiol. 69. 1236-1244
- 129.- MacDermott, A B., L.W Role y S A Siegelbaum (1999) Presynaptic ionotropic receptor and the control of transmitter release Ann Rev Neurosci. 22:443-485
- 130.- Magleby K L (1987) Short-term changes in synaptic efficacy En Synaptic Function Edelman GM, WE Gall y M Cowan (Eds) Wiley & Sons. N Y pp. 21-56
- 131.- Malenka, R C y J D Kocsis (1988) Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro J Neuroscience 8 3750-3756
- 132.- Manabe T, D J Wyllie, D J Perkel y Nicoll RA (1993) Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the

- hippocampus *J Neurophysiol* 70 1451-1459
- 23 - Marin, O., W Smeets y A González (1998) Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS* 21, 487-494
- 24.- Mathie A., L Bernheim y B Hille (1992) Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons *Neuron* 8 907-914
- 25 - McGeer P y E G McGeer (1993) Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia *Adv Neurol* 50 93-101.
- 26 - McGeer, P.L., E.G. McGeer, U. Scherer y K. Singh (1977) A glutamatergic corticostriatal path? *Brain Res* 128: 369-373
- 27.- McGonigle P y P.B. Molinoff (1994) Receptors and signal transduction classification and quantitation En: Siegel G J (Ed.) *Basic Neurochemistry Molecular, cellular and medical aspects* N.Y. Pag 224
- 28 - McKinney M (1993) Muscarinic receptor subtypes-specific coupling to second messenger in neuronal systems. *Prog. Brain Res* 98 333-340.
- 29 - Meldolesi J, P Volpe y T. Pozzan (1988) The intracellular distribution of calcium *TINS* 11 449-452
- 30 - Melmerstein P.G., R.C. Foehning, T Tkatch, W.J Song, G Baranauskas y D.J Surmeier (1999) Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with β subunit expression *J. Neurosci* 19:7268-7277
- 31.- Meza U. y B Adams (1998) G-protein dependent facilitation of neuronal α_{1A} , α_{1B} , and α_{1C} Ca channels *J Neuroscience* 18:5240-5252
- 32 - Miledi R. y R Thies (1971) tetanic and post-tetanic rise in frequency of miniature endplate potentials in low-calcium solutions. *J. Physiol.* 212:245-257
- 33 - Milhouse OE, y L. Heimer (1984) Cell configurations in the olfactory tubercle of the rat. *J Comp Neurol* 228(4):571-97
- 34 - Miljanich, G.P. y J Ramachandran (1995) Antagonist of neural calcium channels Structure, function and therapeutic implications *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 35 707-734.
- 35 - Miller, R J (1998) Presynaptic receptors *Ann Rev Pharmacol. Toxicol* 38 201-227
- 136.- Mink, J W (1996) The basal ganglia Focused selection and inhibition of competing motor programs *Prog Neurobiol.* 50:381-425
- 137 - Mintz, I. M B L Sabatini, y W G Regehr 1995. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron.* 15 675-678
- 138.- Misgeld, U, M Bijak y W Jarolimek (1995) A physiological role for GABA_B receptors and the effects of the baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 46 423-462
- 139 - Misgeld U. P. Calabresi y H U Dodt (1986) Muscarinic modulation of calcium dependent plateau potentials in rat neostriatal neurons *Pflugers Arch* 407: 482-487.
- 140.- Misgeld U, Y. Okada y R. Hassler (1979) Locally evoked potentials in slices of rat neostriatum. A tool for the investigation of intrinsic excitatory processes. *Exp. Brain Res* 34:575-590.
- 141 - Misgeld, U, A Wagner y T Ohno (1982) Depolarizing IPSP's and depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro *Exp Brain Res* 45 108-114.
- 142.- Moratalla, R y N G Bowery (1991) Chronic lesion of cortical fibers reduces GABA_B but not GABA_A binding in rat caudate putamen: An autoradiographic study *Neurochem Res.* 16:309-14.
- 143 - Mott DD y DV Lewis (1994) The pharmacology and function of central GABA_B receptors *Int Rev Neurobiol* 36:97-223.
- 144 - Naraghi M y E Neher (1997) Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel *J. Neurosci* 17 6961-6973
- 145 - Nisenbaum E.S. y T.W Berger (1992a) Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs In vitro analysis *Neuroscience* 48: 579-593
- 146 - Nisenbaum E.S, T.W Berger y A.A Grace (1992b) Presynaptic modulation by GABA_B receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons *J Physiol* 67(2) 477-481
- 147 - Nisenbaum, E S, Berger, T W y Grace, A A (1993) Depression of glutamatergic and GABAergic synaptic responses in striatal spiny neurons by stimulation of pre-

- synaptic GABA_B receptors. *Synapse* 14(3) 221-242
- 3 - Northcutt, R G (1981) Evolution of the telencephalon in non-mammals *Ann Rev Neurosci.* 4 301-350.
- 9 - Page K.M., C. Cantì, G.J Stephens, N S Berrow y A C. Dolphin (1998) Identification of the amino terminus of neuronal Ca²⁺ α1 subunit α_{1B} and α_{1E} as an essential determinant of G-protein modulation *J Neuroscience* 18 4815-4824.
- 0 - Parent A, y L N Hazrati (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia I The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop *Brain Res Brain Res Rev* 20(1) 91-127
- 1 - Parent A, y L N Hazrati. (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia II The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev.* 20(1):128-154.
- 12 - Parnas H J Dudel y I. Parnas (1982) Neurotransmitter release and its facilitation in crayfish. I Saturation kinetics of release and of entry and removal calcium *Pflugers Arch* 393 1-14
- 53 - Pasternak G W (1988) The opioid receptors Humana Press Clifton, NJ, USA
- 54 - Pennartz, C M A y F H Lopes-da-Silva (1994) Muscarinic modulation of synaptic transmission in slices of the rat ventral striatum is dependent on the frequency of afferent stimulation *Brain Res* 645:231-239
- 55 - Penner, R, C. Fasolato y M Hoth (1993) Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol.* 3:368-374.
- 56 - Perkington y T Sihra (1998) Presynaptic GABA_B receptor modulation of glutamate exocytosis from rat cerebrocortical nerve terminals Receptor decoupling by protein kinase C. *J Neurochem* 70:1513-1522
- 57 - Pineda, J.C, J. Bargas, J Flores-Hernández y E. Galarraga (1995) Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons *Eur. J Pharmacol.* 281 271-277
- 58 - Pineda J.C., E Galarraga, y R C Foecking (1999) Different Ca²⁺ source for slow AHP in completely adapting and repetitive firing pyramidal neurons *Neuroreport* 10 1951-1956
- 59 - Qian, J y P Saggau (1997) Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors Involvement of presynaptic calcium influx *British J Pharmacol.* 122:511-519.
- 160 - Rahamimoff R. (1968) A dual action of calcium ions on neuromuscular facilitation *J. Physiol* 195:471-480.
- 161 - Rausche, G., J.M. Sarvey y U Heinemann (1988) Lowering extracellular calcium reverses paired pulse habituation into facilitation in dentate granule cells and removes a late IPSP. *Neurosci. Lett* 88 275-280.
- 162 - Reiner A., S E. Brauth y H J. Karten (1984) Evolution of the amniote basal ganglia. *TINS* 7: 320-325.
- 163.- Reiner A., L Medina y C L Veenman (1998) Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates *Brain Res Rev* 28: 235-285.
- 164 - Reikling J.C. y J.L. Feldman (1997) Calcium-dependent plateau potentials in rostral ambiguous neurons in the newborn mouse brain stem in vitro *J Neurophysiol.* 78: 2483-2492.
- 165 - Rettig, J., C Heinemann, U Ashery, Z. Sheng, C T Yokoyama, W A Catterall y E Neher (1997) Alteration of Ca²⁺ dependence of neurotransmitter release by disruption of Ca²⁺ channel/syntaxin interaction *J. Neuroscience* 17:6647-6656
- 166 - Roche J.P. y S.N. Treisman (1998) Ca²⁺ channel β₃ subunit enhances voltage-dependent relief of G-protein inhibition induced by muscarinic receptor activation and G_{βγ}. *J. Neuroscience* 18:4883-4890
- 167 - Sanchez-Prieto J.; D C Budd; I Herrero; E. Vázquez y D G Nicoli (1996) Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *TINS* 19:235-239
- 168 - Scanziani, M., Gähwiler, B H y Thompson, S.M. (1995) Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are the Ca²⁺ channels involved? *Neuropharmacol* 11: 1549-1557
- 169 - Schwindt P y W Crill (1980) Role of persistent inward current in motoneuron bursting during spinal seizures *J. Neurophysiol* 43: 1296-1318
- 170 - Seabrook G R, W Howson y M G Lacey (1991) Subpopulations of GABA-mediated synaptic potentials in slices of rat dorsal striatum are differentially modulated by presynaptic GABA_B receptors *Brain Res* 562 332-334

- 71- Shepherd G.M. y C Koch (1998) Introduction to synaptic circuits. En: Shepherd G. M (Ed) The synaptic organization of the brain 4^a Ed Oxford University Press pp 1-36.
- 72- Simon A.M y D.A. Goudenough (1998) Diverse functions of vertebrate gap junctions. Trends in Cell Biology 8:477-483
- 73- Smith Y.; M.D Devan, E, Shink y J.P Bolam (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. Neuroscience 86:353-387.
- 74- Smolders I.; N. De-Klippel, S Sarre, G. Ebinger y Y Michotte (1995) Tonic GABAergic modulation of striatal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. Eur J. Pharmacol 284:83-91
- 175- Sodickson, D.L. y B.P. Bean (1996) GABA_B receptor activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. J. Neurosci 16:6374-6385.
- 176- Soliakov L. y S. Wonnacott (1996) Voltage sensitive calcium channels involved in nicotinic receptor-mediated [³H] dopamine release from rat striatal synaptosomes. J Neurochem. 67:163-170.
- 177.- Somogyi, P. Bolam, J.P. y Smith, A (1981) Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. J Comp. Neurol. 195: 567-584.
- 178 - Stevens C.F. y Y Wang (1995) Facilitation and depression at single central synapses. Neuron 14: 795-802
- 179 - Stoof, J.C., B. Drukarch, P. De-Boer, B.H.C. Westerink y H.J. Groenewegen (1992) Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. Neuroscience 47:755-770.
- 180 - Sugita S., N. Uchimura, Z.G. Jiang y R.A. North (1991) Distinct muscarinic receptors inhibit release of γ -aminobutyric acid and excitatory aminoacids in mammalian brain. Proc. Natl Acad. Sci 88:2608-2611.
- 181 - Takagi, H., P. Somogyi; J. Somogyi y A.D. Smith (1983) Fine structural studies of a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study. J Comp Neurol 214 1-16
- 182.- Takagi M y C Yamamoto (1978) Suppressing action of cholinergic agents on synaptic transmission in the corpus striatum of rats. Exp Neurol 62 433-443
- 183.- Takahashi T.; Y. Kajikawa y T Tsujimoto (1998) G-protein coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA_B receptor. J. Neurosci 18:3138-3146
- 184 - Thompson, R.F y J.J. Kim. (1990) Memory systems in the brain and localization of a memory. Proc Natl Acad Sci USA 93 13438-13444
- 185.- Thompson A.M., J. Deuchars y D.C. West (1993a) Long, deep layer pyramidal single axon EPSPs in slices of rat motor cortex display paired-pulse and frequency-dependent depression mediated presynaptically, and self-facilitation mediated postsynaptically. J Neurophysiol 70:2354-2369
- 186 - Thompson, S.M, Capogna, M y Scanziani, M. (1993b) Presynaptic inhibition in the hippocampus. TINS. 16: 222-227
- 187.- Travagli R.A.; M. Ulivi; y W.J Wojcik (1991) Gamma amino butyric 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
- 188.- Voorn P., C.R. Gerfen, H.J. Groenewegen (1989) Compartmental organization of the ventral striatum of the rat. Immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein. J Comp Neurol 289(2):189-201
- 189.- Wall P.D (1998) Some unanswered questions about the mechanisms and function of presynaptic inhibition. En: Rudomin, P; Romo, R. y Mendell L.M. (Eds.) presynaptic inhibition and neural control. Oxford University Press. pp 228-241
- 190 - Walker, D y M. De-Waard (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels. Role in channel function. TINS 21(4) 148-154
- 191.- Wall, M.J y N. Dale. (1994) GABA_B receptors modulate an ω -conotoxin-sensitive calcium current that is required for synaptic transmission in the *Xenopus* embryo spinal cord. J Neuroscience 14(10) 6248-6255
- 192 - Wallend P y S Grillner (1987) N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent os-

- illatory activity in neurons active during fictive locomotion in lamprey J. Neurosci 16: 2397-2410.
- 93.- Waimnsley, B., F J Alvarez y R.E.W. Fyffe (1998) Diversity of structure and function at mammalian central synapses. TINS 21:81-88.
- 94.- Wang, H. y V.M. Pickel, (1998). Dendritic spines containing μ -opioid receptors in rat striatal patches receive asymmetric synapses from prefrontal corticostriatal afferents. J. Comp Neurol 396:223-237
- 95.- Wang H.; A. Morikawi, J.B Wang, G.R. Uhl y V.M. Pickel (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of μ opioid receptors and leu5-enkephalin in the patch compartment of the rat caudate-putamen nucleus J Comp. Neurol 375:659-674.
- 196.- Wang H.; A. Morikawi, J.B. Wang, G R Uhl y V.M. Pickel (1997) Ultrastructural immunocytochemical localization of μ opioid receptors in dendritic targets of dopaminergic terminals in rat caudate-putamen nucleus Neurosci 81: 757-771
- 197.- Weiler M (1989) Muscarinic modulation of endogenous acetylcholine release in rat neostriatal slices J Pharmacol Exp Ther 250:617- 623
- 198 - Wess, J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function TIPS 141:308-313.
- 199.- Wheeler D B., A. Randall y R.W. Tsien (1994a) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science 264:107-111
- 200 - Wheeler D B., R W Tsien y A Randall (1994b) Identification of calcium channels that control neurosecretion Science 266:828-831
- 201 - Wickens, J.R y C. Wilson (1998) Regulation of action potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo. J Neurophysiol 79: 2358-2364.
- 202 - Wickman, K y Clapham, D.E. (1995) Ion channels regulation by G proteins Physiol Rev 75(4) 865-85
- 203.- Williams, S y D Johnston (1993) Muscarinic cholinergic inhibition of glutamatergic transmission En: Dunwiddie, T y D. Lovinger (Eds) Presynaptic receptors in the mammalian brain Ed Birkhauser. Boston pp 27-41
- 204 - Wilson C.J, Chang HT, Kitai ST (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum J Neurosci 10 508-519
- 205.- Wilson, C. (1998) The Basal Ganglia In: Shepherd, G M. (Ed) The synaptic organization of the brain. 4^a Ed. Oxford University press. N Y pp 329-375
- 206.- Wu, L.G y P. Saggau (1994a) Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3 to CA1 synapses of the hippocampus. J Neurosci 14: 5613-5622.
- 207.- Wu, L G y P Saggau (1994b) Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of the hippocampus. Neuron. 12: 1139-1148
- 208.- Wu, L.G y P Saggau (1994c) Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. J. Neurosci 14(2):645-654
- 209.- Wu, L.G. y P. Saggau (1995) GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca^{2+} influx. J Physiol. Lond 485. 649-657.
- 210 - Wu, L.G y P. Saggau (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. TINS 20(5) 204-212.
- 211.- Yamamoto C. (1973) Neurotransmitter actions studied in brain slices Adv Neurol Sci 17:64-70
- 212 - Zimmerman H. (1993) Synaptic transmission, cellular and molecular basis. Oxford University Press. N.Y pp 111-117.
- 213.- Zucker, R S (1989) Short-term plasticity. Ann. Rev Neurosci 12:13-31.
- 214.- Zucker, R S (1996) Exocytosis A molecular and physiological perspective Neuron 17:1049-1055
- 215 - Zucker, R.S. (1999) Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. Curr Opin. Neurobiol 19:305-313.
- 216 - De Waard M., C.A. Gurnett y K P Campbell (1996) Structural and functional diversity of voltage activated calcium channels. En: Ion Channels Vol 4 T Narahashi (Ed) Plenum press. N.Y. pp 41-87
- 217 - Olivera B.M. G Miljanich, J Ramachandran y M E. Adams (1994) Calcium Channel diversity and neurotransmitter release The -conotoxins and -agatoxins. Annu Rev Biochem. 63. 823-867
- 218 - Randall A y R W Tsien (1995) Pharmacological dissection of multiple types of

Ca²⁺ calcium channels currents in rat cerebellar granule neurons J Neurosci. 15: 2995-3012

- 219 - Tarelus E y H Breer (1995) Presynaptic calcium channels. Pharmacology and regulation. Neurochem Int 26 539-558
- 220.- Varadı G.; Y Mori, G. Mikala y S Arnold (1995) Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drud action TiPS 16: 43-49
- 221 - Verhage M.; W E.J.M. Ghijzen y F.H Lopes da Silva (1994) Presynaptic plasticity the regulation of Ca²⁺ dependent transmitter release. Prog. Neurobiol. 42. 539-574