

81

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

"MODULACION PRESINAPTICA DE LAS
AFERENTES GLUTAMATERGICAS
NEOESTRIATALES POR LA ACTIVACION DE
RECEPTORES A OPIACEOS μ Y δ "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ERNESTO MENDOZA DUARTE

293739

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO

LOS EXPERIMENTOS DEL PRESENTE TRABAJO SE REALIZARON EN EL LABORATORIO
DEL DR. JOSE BARGAS DIAZ DEL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR DE LA UNAM

MEXICO, D. F.

2001.



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 las facilidades por parte de la **E.N.E.P. Iztacala** dentro del **Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL)**.

Este trabajo fue realizado con recursos aportados por la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** de la **Universidad Nacional Autónoma de México (IN202300)** y **CONACYT (31839-N)**.

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio del Dr. José Bargas Díaz** en el **Instituto de Fisiología Celular**, en la **Universidad Nacional Autónoma de México** durante el período comprendido desde **Marzo de 1999** a **Diciembre de 2000**.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **M. en C. Jaime Aurelio Barral Caballero**, Proyecto Neurociencias de la **U.I.I.C.S.E., E.N.E.P. Iztacala**.

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud al Dr. José Bargas Díaz por la confianza depositada en mi y por todo el tiempo dedicado durante mi estancia en su laboratorio.

A la M. en C. Ma. Del Carmen Vilchis Quintero por su apoyo en todo momento.

Al M. en C. Jaime Aurelio Barral Caballero por la dirección del presente trabajo.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado en la revisión de la Tesis y por sus valiosos comentarios:

M. en C. Bertha Segura Alegría

M. en C. Jorge R. Gersenowies Rodriguez

Biol. Hugo V. Perales Vela

Biol. Hugo Castro Cortez

Dedico el presente trabajo:

A mis padres: Gabina

Manuel Salvador

Por todo su amor, cariño y apoyo brindado en todo momento.

A mi hermano Clemente

A mi hermana Adriana

Por todo su apoyo en todo el tiempo de mi carrera.

A mis abuelos: Ma. De Jesus

Sacramento

A mis tios: Rigoberto, Evelia, Elizabeth.

Baltazar y Fidencia por el apoyo moral que me han brindado siempre que lo he necesitado.

Dedico este trabajo al Sr. Angel Castillo y la Sra. Ma. de Lourdes

Por la confianza y apoyo brindado.

A mi novia: Beatriz Adriana Castillo Juárez

Por levantar mi ánimo cuando más lo he necesitado.

A todos mis amigos: Fidel, Leticia, Beatriz, Alex, Oscar Angel, Beto y Chayo, Malena (abuela), Rogelio, Humberto, Paco, Carmen, Tamara, Xochitl, Nadia, Celia, Monica, Enrique, Velia, Carlos, Gaby y Lorena, Joaquín y Areli, Daniel, Oscar, Hector, Abdul, Cintia, Silvia.....

RESUMEN

El neoestriado es uno de los núcleos con altos niveles de péptidos opioides. La distribución de los receptores opioides en este núcleo está organizada en el patrón de mosaico de parches y matriz. Se ha mostrado en otras regiones del cerebro que la activación de receptores a opiáceos resulta en una modulación de canales de calcio/potasio.

En este trabajo se investigó el papel de los receptores a opiáceos tipo δ y μ en la modulación de la liberación de neurotransmisor de las aferentes glutamatérgicas que provienen de la corteza cerebral. Se ha mostrado que la liberación depende de la entrada de calcio a través de diferentes tipos de canales de calcio (N, P/Q y R).

El protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP) en los potenciales de campo es una de las herramientas para evaluar eventos de inhibición presináptica.

La aplicación de 1 μ M de DPDPE (agonista del receptor δ) y 1 μ M de DAMGO (agonista del receptor μ) produjeron un incremento de la FPP en un 70% y 56% respectivamente, mostrando un efecto de inhibición presináptica. En presencia de bloqueadores de los canales de calcio ω -CgTx-GVIA 1 μ M, ω -AgTx-TK 30 y 400 nM, (N, P y Q respectivamente), el DPDPE y DAMGO siguen teniendo efecto incrementando la FPP. Por lo que se concluye, que la activación de los receptores tipo δ y μ no producen inhibición de la liberación a través de la modulación de la entrada de calcio.

Los resultados sugieren que la inhibición de la liberación de glutamato en estas terminales puede estar dada por la activación de conductancias de K^+ u otros mecanismos.

ÍNDICE

Ganglios Basales	2
Aferencias y eferencias de los ganglios basales	2
Organización del Neoestriado	4
Neuronas principales del neoestriado	4
Interneuronas	5
Transmisión sináptica y modulación	6
Modulación presináptica	10
Canales de calcio	13
Estructura de los canales de calcio	13
Clasificación de los canales de calcio	15
Péptidos opioides	17
Encefalinas	17
Endorfinas	17
Dinorfinas	17
Distribución de los péptidos opioides en el sistema nervioso central	19
Receptores opioides	19
Biología molecular de los receptores a opiáceos	20
Receptor δ	22
Receptor μ	23
Receptor κ	24
Modulación presináptica en el neoestriado	24
Modulación por opiáceos en el neoestriado	24
Objetivos	27
Material y método	27
Preparación	27
El potencial de campo	28
Potencial de campo en el neoestriado	31
Sistema de estimulación y registro	32
Protocolo de facilitación por pulso pareado	33
Oclusión farmacológica	35
Resultados	36
Influencia del calcio en el potencial ortodrómico de campo	36
Efecto de la activación del receptor δ	38
Efecto del bloqueo de diferentes tipos de canal de calcio sobre la acción del receptor δ	40
Efecto del DPDPE en presencia de ω -CgTx-GVIA	40
Efecto de DPDPE en presencia de ω -AgTx-TK (30 nM)	41
Efecto de DPDPE en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM)	45
Resumen	47

Efecto de la activación del receptor μ	47
Efecto del bloqueo de diferentes tipos de canal de calcio sobre la acción del receptor μ	50
Efecto de DAMGO en presencia de ω -CgTx-GVIA	50
Efecto de DAMGO en presencia de ω -AgTx-TK (30 nM)	52
Efecto de DAMGO en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM)	52
Resumen	55
Análisis y discusión	56
Conclusiones	63
Bibliografía	64

INTRODUCCION

GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son núcleos subcorticales (Arbib y Szentágothai, 1998) del cerebro medio y anterior, están constituidos por el neocestriado (formado por los núcleos caudado (Cd) y putamen (Put)) , núcleo acumbens, sustancia *nigra pars reticulata* (SNr), sustancia *nigra pars compacta* (SNc), los globos pálido externo (GPe) e interno (GPi), y el núcleo subtalámico (STN) (Brodal, 1992; Wilson, 1998). Estos núcleos desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones motoras, el mantenimiento de la postura, en particular, la planificación, iniciación y ejecución del movimiento (Bargas, et al., 1998a; Graybiel, 1990).

La degeneración de estos núcleos está relacionada con la alteración de movimientos voluntarios, presentes en algunas enfermedades como la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourett, las discinesias, y la corea de Huntington (Lovinger y Tyler, 1996; Wilson, 1998). Por lo que los GB han sido objeto de estudio desde hace muchos años.

AFERENCIAS Y EFERENCIAS DE LOS GANGLIOS BASALES

El neocestriado (NE) es la principal entrada de información a los GB, recibe proyecciones de diferentes áreas de la corteza cerebral, incluyendo áreas motoras, sensoriales, de asociación y límbicas (Brodal, 1992; Bargas, et al., 1998a). Estas aferencias son excitatorias, y están mediadas por neuronas piramidales glutamatérgicas (glu) las cuales hacen sinápsis en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas (NEMs) de proyección (Bargas, et al., 1998a). El NE también recibe entradas glutamatérgicas de los núcleos centromediano y parafascicular del tálamo (Sadikot, et al., 1990), dopaminérgicas de la SNc, y serotoninérgicas de los núcleos del rafé (Lovinger y Tyler, 1996). Además recibe

entradas GABAérgicas del GPe (Graybiel y Ragsdale, 1983). Por otro lado, las NEMs del NE proyectan a los núcleos GPi/SNr (vía directa) y hacia el GPe (vía indirecta).

La *vía directa*, es la proyección estriatal (GABA/sustancia P/dinorfina) hacia el GPi y la SNr (núcleos de salida), los cuales proyectan al talamo, enviando proyecciones GABAérgicas. Esta vía cierra el circuito con la conexión del talamo (proyecciones glutamatérgicas) hacia la corteza. Por otro lado, la *vía indirecta*, es la proyección del NE (GABA/enk) hacia el GPe, el cual proyecta hacia el STN y éste a su vez proyecta hacia el complejo GPi/SNr. (Figura 1) (Arbib y Szentágothai, 1998).

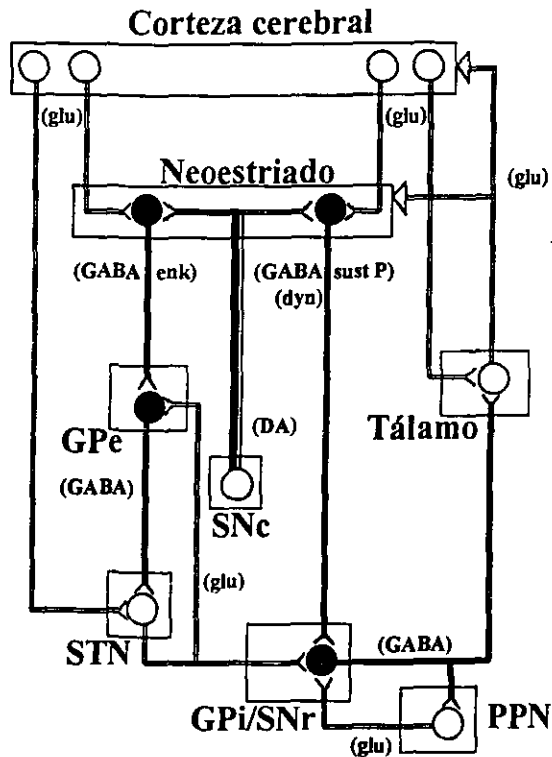


Figura 1. Conexiones de los Ganglios Basales. Vías directa e indirecta y neurotransmisores involucrados: glutamato (glu), ácido gamma-aminobutírico (GABA), encefalinas (enk), dinorfina (dyn), sustancia P (sust P) dopamina (DA) (Modificado de Arbib y Szentágothai, 1998).

ORGANIZACION DEL NEOESTRIADO

El NE es el núcleo más grande de los GB y la principal vía de entrada a estos núcleos, es el centro de refinamiento motor, almacén de información y registro de movimiento (Lovinger y Tyler, 1996). El NE se compone de dos tipos de compartimentos especializados neuroquímicamente: los parches o estriosomas (zonas poco reactivas a marcadores para acetil colinesterasa) que miden menos de 1mm de diámetro y ocupan del 10-20% del volumen del neostriado (Graybiel, 1990). El otro compartimento es la matriz, que rodea a los estriosomas (Arbib y, Szentágothai, 1998; Graybiel, y Ragsdale, 1978; Graybiel, 1990). El NE recibe proyecciones de todas las áreas de la corteza cerebral encargadas de la sensación y el movimiento (Arbib y Szentágothai, 1998). Estas, llevan información hacia la matriz, mientras que las proyecciones límbicas terminan en los estriosomas (Arbib y Szentágothai, 1998; Graybiel, 1990).

NEURONAS PRINCIPALES DEL NEOESTRIADO

En la rata, 95% de la población neuronal del NE se componen de NEMs de proyección (DiFiglia, et al., 1976). Estas neuronas, sintetizan y liberan ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Yoshida y Precht, 1971; Brodal 1992), por lo que sus botones terminales son inhibitorios (Precht y Yoshida, 1971). También, sintetizan y coliberan diferentes péptidos como: encefalinas (ENK), sustancia P (SP), y dinorfina (DYN), según el núcleo al que proyectan (Arbib y Szentágothai, 1998).

El soma de la NEM tiene un diámetro de 12-18 μm , del cual surgen los troncos dendríticos que presentan de 25-30 ramas dendríticas terminales que irradian en todas direcciones en un radio de 300-500 μm . Las dendritas presentan gran cantidad de espinas donde hacen contacto sináptico las aferentes. El axón de la NEM se origina en el soma o en un tronco dendrítico proximal (Wilson, 1998). Antes de alejarse del soma, el axón proyecta varias ramas colaterales que deja dentro del NE y

que hacen sinápsis con otras NEMs (Kita, et al., 1990); por lo que se piensa que ejercen inhibición entre ellas (Katayama, et al., 1981; Park, et al., 1980).

INTERNEURONAS

Existen otros tipos de neuronas que no proyectan fuera del NE, se trata de interneuronas que constituyen un pequeño porcentaje de la población neuronal de este núcleo. Las más conocidas son:

Las interneuronas gigantes colinérgicas, que fueron identificadas por la presencia de colina acetiltransferasa (ChAT) (Bolam, et al., 1984) y representan menos del 2% de la población neocortical en la rata. Su soma es de forma alargada con un diámetro de 50-60 μm , las dendritas presentan apéndices y varicosidades, a pesar de ser un número reducido, estas interneuronas inervan profusamente al neocórtex ejerciendo una gran influencia sobre el umbral de activación de las NEMs (Kawaguchi, et al., 1995).

También se encuentran las **interneuronas GABAérgicas**, que se distinguen de las de proyección por la presencia de parvalbúmina (proteína intracelular que amortigua Ca^{2+}) y por su alta concentración de GABA, representan del 3-5% de la población. El soma es de tamaño similar al de las NEMs, presentan dendritas varicosas y una gran arborización axonal y dendrítica (Kawaguchi, et al., 1995).

El tercer grupo, son **interneuronas somatostatinérgicas** (que contienen somatostatina/óxido nítrico) también de tipo GABAérgico, presentan pocas ramas dendríticas sin espinas y un campo axonal extenso. Constituyen del 1-2% de la población neocortical (Kawaguchi, et al., 1995).

TRANSMISION SINÁPTICA Y MODULACIÓN.

La transmisión sináptica ocurre mediante la sinapsis (termino derivado del griego **sinapse**; syn: junto y haptain: fijar o sujetar). Son lugares especializados donde las neuronas hacen contacto con otras células, para enviar o recibir información (Shepherd y Phil, 1994).

Se conocen dos tipos de transmisión sináptica: eléctrica y química.

Las sinapsis eléctricas están conectadas por uniones comunicantes. El flujo de iones a través de estos canales es directo por lo tanto las señales son transmitidas directamente de una a otra célula. En estas sinapsis, el potencial de acción se genera rápidamente y por tanto, la velocidad de conducción es mayor.

En la sinapsis química, la comunicación célula a célula esta dada a través de la liberación de neurotransmisor desde la terminal sináptica o presinápsis, hasta el espacio sináptico. La llegada de un potencial de acción despolariza la membrana presináptica, lo que provoca la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (Matthews, 1996). El incremento de calcio interno en la terminal provoca la liberación de neurotransmisor hacia el espacio sináptico. Este actúa sobre receptores postsinápticos, provocando diferentes reacciones celulares dependiendo del neurotransmisor liberado (Figura 2) (Shepherd y Phil, 1994).

Transmisión sináptica

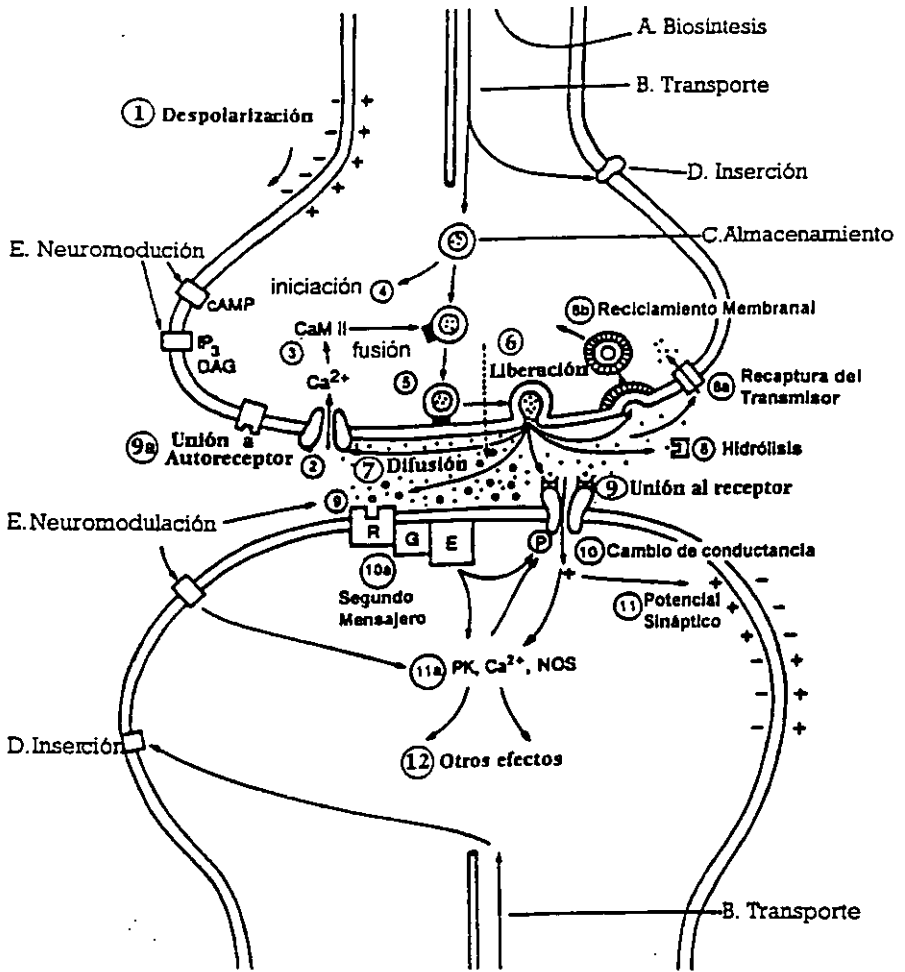


Figura 2. Sinapsis química. Procesos sinápticos A-E (síntesis, transporte y almacenamiento de neurotransmisor), 1-12 muestra los procesos que participan en la transmisión de señales. IP3, inositol trifosfato; CAM II, proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺/Calmodulina; DG, diacilglicerol; PK, proteína cinasa; R, receptor; G, proteína G; AC, adenilato ciclasa (Modificado de Shepherd y Phil 1994).

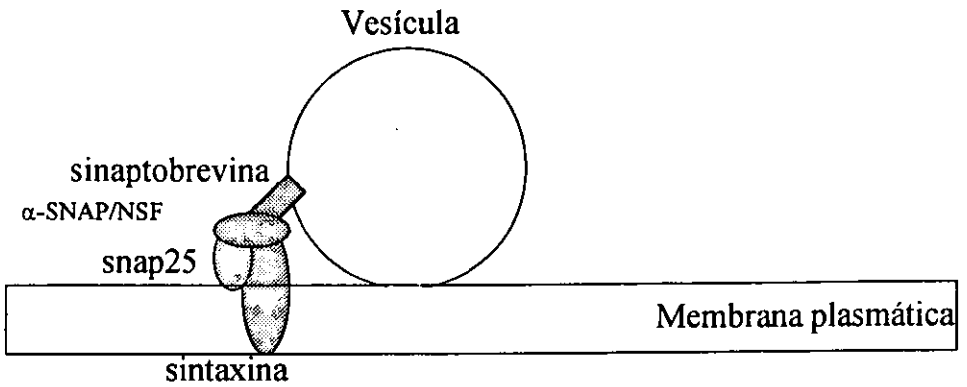
El proceso de liberación de neurotransmisor involucra varios elementos importantes como se describe a continuación:

En la terminal sináptica, las vesículas que contienen el neurotransmisor están ancladas cerca de sitios activos de liberación por medio de un complejo multiprotéico que involucra a proteínas de la membrana vesicular, la membrana presináptica, (algunas de estas proteínas responden a señales del calcio) y otros elementos que ayudan al anclaje de la vesícula. Una vez ancladas están listas para liberar el neurotransmisor en respuesta a un estímulo apropiado (normalmente a un incremento en el calcio interno) (Matthews, 1996; Zucker, 1996).

Inicialmente se forma un complejo entre las proteínas syntaxina 1A y SNAP-25 de la membrana plasmática y la sinaptobrevina de la membrana vesicular en una proporción de 1:1:1 (Matthews, 1996; De Bello et al., 1995). Estas proteínas forman la base para la unión de la proteína α -SNAP a la que se une NSF (ATPasa sensible a N-etilmaleimida). La hidrólisis de ATP junto con la disociación de NSF/ α -SNAP, puede causar una fusión parcial de la vesícula con la membrana plasmática, de esta manera las vesículas están listas para la liberación final (Miller, 1998).

El calcio que entra a través de los canales de calcio da la señal para provocar la liberación de neurotransmisor (Catterall, 1998). El probable sensor de calcio para la liberación es la proteína de membrana vesicular sinaptotagmina (Geppert, et al., 1994). Otros elementos pueden ser importantes en el proceso de liberación final como la proteína vesicular rab3A y la generación local de fosfolípidos inositol que se unen a la sinaptotagmina (Sudhof, 1997; Bean y Scheller, 1997). La subunidad α 1 del canal de calcio puede asociarse con el complejo de liberación, esta interacción ocurre entre una región específica del dominio II y III de la subunidad α 1 del canal de calcio y la syntaxina 1A, también, puede interactuar con SNAP-25 (Figura 3) (Yokoyama, et al., 1997).

A



B

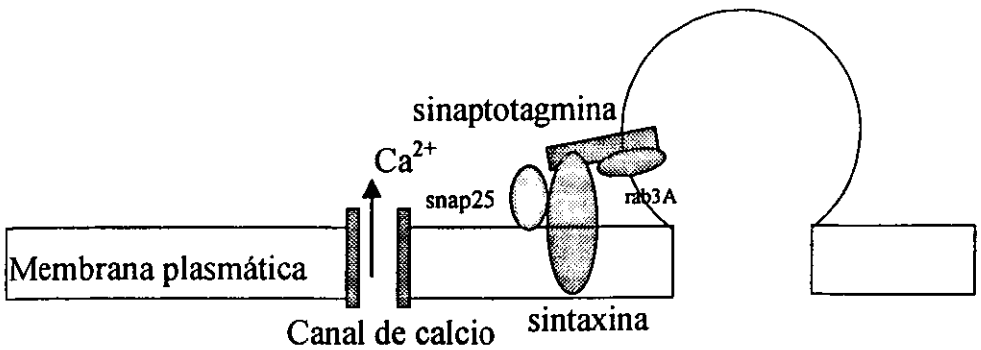


Figura 3. Proceso de liberación de neurotransmisor. (A) Formación del complejo de proteínas sintaxina 1A , snap-25 y sinaptobrevina a quien se les une α -SNAP/NSF que a su disociación por medio de ATP hacen una fusión parcial de la vesícula. (B) El Ca^{2+} que entra a través de los canales de calcio provoca la liberación del neurotransmisor al llegar al sensor de calcio (sinaptotagmina) (Miller, 1998).

MODULACIÓN PRESINÁPTICA.

Formas de modulación sináptica tales como el control de la liberación de neurotransmisor, son importantes para la comunicación sináptica (Lovinger y Tyler, 1996). La liberación de neurotransmisor está modulada por diversos factores. Esta modulación está dada por la activación de receptores presinápticos de los cuales se conocen dos tipos: autorreceptores (receptores que se activan por el mismo transmisor liberado) o heterorreceptores (se activan por un transmisor liberado por otra neurona) (Miller, 1998).

Existen al menos tres mecanismos por los cuales la activación de los diferentes tipos de receptor presináptico modulan la liberación de neurotransmisor en el sistema nervioso central: (a) la activación de canales de potasio, (b) modulación directa de uno o más componentes del aparato de liberación vesicular y (c) la inhibición de los canales de calcio de la terminal nerviosa (Miller, 1998; Misgelg, et al, 1995).

Activación de canales de potasio y cloro. La estimulación de receptores presinápticos puede activar conductancias de K^+ o Cl^- que reducen la amplitud y duración del potencial de acción en la terminal sináptica. El flujo de calcio hacia el interior de la terminal se ve entonces reducido. Por tanto, la cantidad de neurotransmisor liberado es menor.

Modulación del aparato vesicular. Para que el neurotransmisor sea liberado, las vesículas deben fusionarse a la membrana por medio del complejo de proteínas vesiculares y de membrana. El complejo formado pone a las vesículas listas para liberar el neurotransmisor. La activación de receptores presinápticos puede bloquear una o más de las proteínas del complejo. De esta manera se puede modular el proceso de liberación en un punto distal a la entrada de calcio.

Inhibición de los canales de calcio. El flujo de calcio a través de canales presinápticos dispara la liberación de neurotransmisor y la fusión de las vesículas. Los canales de calcio pueden ser modulados por la activación de proteínas G, ya que éstas pueden inducir cambios en las propiedades de los canales de calcio. Las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G se unen al dominio I y II de la subunidad α_1 del canal de calcio, la cual forma el poro (Herlitz, et al., 1996).

La modulación de las propiedades de los canales iónicos es importante para la regulación de la actividad neuronal. La modulación de los canales de calcio ha sido uno de los mecanismos más aceptados hasta el momento y por el cual se puede explicar gran parte de la modulación presináptica.

La modulación presináptica, generalmente se da a través de vías de señalización que involucran la activación de proteínas G, u otras vías que actúan sobre los canales iónicos (Bargas y Galarraga, 1995; Brody y Yue, 2000). Estas proteínas, están adosadas a la cara interna de la membrana celular (Shepherd y Phil, 1994). La estimulación de las proteínas G resulta en la regulación de una gran variedad de enzimas, transporte vesicular, así como la apertura o cierre de canales iónicos (Hamm y Gilchrist, 1996).

Las proteínas G tienen una estructura heterotrimérica compuesta por diferentes subunidades: α , β , y γ . En estado inactivo una molécula de guanosin difosfato (GDP) está pegada a la subunidad α (De Waard, et al., 1997). La activación de estas proteínas produce un intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, ésta se disocia de la subunidad $G\beta\gamma$ activando a la adenilato ciclasa que incrementa los niveles de AMPc a partir de ATP promoviendo la activación de proteínas que pueden tener un efecto directo sobre canales iónicos u otras proteínas (Zamponi, et al., 1997). La subunidad $\beta\gamma$ ejerce su efecto sobre el dominio I y II de la subunidad α_1 del canal de calcio (Herlitz, et al., 1996; Wu y Saggau, 1997).

La unión citoplasmática de los dominios I y II de la subunidad α_1 del canal de calcio, presenta un dominio de interacción con una secuencia de 18 aminoácidos, de los cuales 9 residuos están altamente conservados (QQ-E—L-GY—WI—E) y son el sitio de unión de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (Figura 4) (De Waard, et al., 1997).

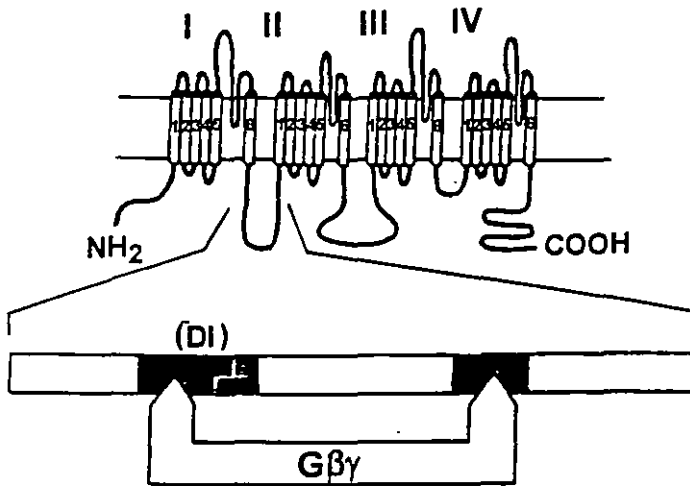


Figura 4. Interacción del complejo $G\beta\gamma$ con el asa intracelular que une los dominios I-II de la subunidad α_1 del canal de calcio (DI, dominio de interacción) (Tomado de De Waard, et al., 1997).

Tomando en cuenta que uno de los mecanismos más importantes para la modulación presináptica es la inhibición de la entrada de calcio a través de los diferentes tipos de canales de calcio, describo a continuación algunas características importantes de estos canales.

CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio están presentes en todas las células excitables (Hille, 1992; Wheeler, et al., 1994). La entrada de calcio a través de los canales (Llinás et al., 1992), participa en diferentes procesos fisiológicos tales como la excitabilidad, la secreción de hormonas, la contracción muscular, expresión y transcripción de genes, la activación e inactivación de canales iónicos (Catterall, 1998; Hille, 1992) y la liberación de neurotransmisor (Katz y Miledi, 1970; Wheeler, et al., 1994).

ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE CALCIO.

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC) están constituidos por varias subunidades: la subunidad α_1 (de 190-250 kDa) que forma el poro y las subunidades auxiliares: β , γ , y $\alpha_2\delta$ (Catterall, 1998; Walker y De Waard, 1998). La subunidad α_1 tiene 4 dominios estructurales, cada uno de los cuales, tiene 6 regiones transmembranales (S1-S6) donde la región S4 posee lisinas y argininas con carga positiva, por lo que se sugiere que forman parte del sensor de voltaje (Tanabe, et al., 1987). Esta región se mueve hacia fuera cuando llega una despolarización, de esta manera se cambia la conformación del poro para que se abra el canal (Yamaguchi, et al., 1999). La subunidad α_1 presenta cuatro residuos de glutamato con cargas negativas los cuales forman parte de cada dominio que está cerca de la región transmembranal del poro (Tanabe, et al., 1993). Estos residuos le confieren la selectividad por el calcio. Los antagonistas farmacológicos se unen a esta subunidad (Figura 5) (Snutch y Reiner, 1992).

La variabilidad de la subunidad α_1 da origen a los diferentes canales de calcio que existen: α_{1A} para el canal P/Q, α_{1B} para el canal N, α_{1E} para el canal R, $\alpha_{1D/S/C/F}$ para los canales L, y $\alpha_{1H/G}$ para los canales T (Jones, et al., 1998).

La subunidad β tiene un peso de 56 KDa, es una proteína hidrofílica, presenta un sitio de fosforilación y se localiza en el sitio intracelular de la membrana (Catterall, 1998) unida a la subunidad α_1 .

La subunidad γ tiene un peso de 30 KDa, es una glucoproteína con cuatro segmentos transmembranales, está subunidad presenta varios sitios de glucosilación. La subunidad α_2 es una proteína de 143 KDa, también presenta sitios de glucosilación, esta proteína se encuentra fuera de la membrana unida a la subunidad δ por medio de puentes disulfuro. Esta subunidad está formada de un solo segmento transmembranal y tiene un peso de 27 KDa (Figura 5) (Catterall, 1998).

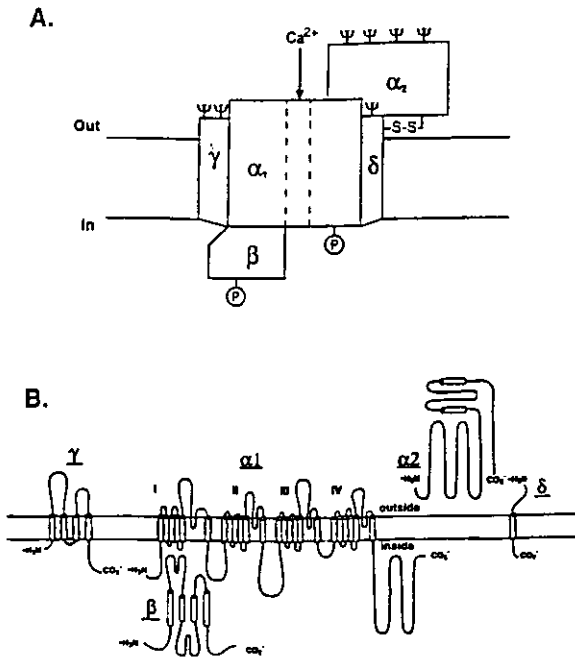


Figura 5. Estructura del canal de calcio. En A se observa la composición de las subunidades del canal de calcio y su estructura donde se observan sitios de fosforilación (P) y sitios de glucosilación (ψ). En B modelo transmembranal de las subunidades del canal de calcio (Tomado de Catterall, 1998).

CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO.

Los diferentes tipos de canal de calcio han sido clasificados de acuerdo con sus propiedades biofísicas, fisiológicas, sensibilidad farmacológica y a su voltaje de activación e inactivación (Catterall, 1998). Electrofisiológicamente los canales de calcio se clasifican en dos grupos: activados por bajo voltaje (LVA) que corresponden a los canales tipo T y los activados por alto voltaje (HVA) donde se encuentran a los canales tipo N, L, P/Q y R. (Catterall, 1998). Farmacológicamente los canales se han clasificado de acuerdo a la sensibilidad a diferentes toxinas selectivas (Wu y Saggau, 1997; Kamiya, et al., 1988; Teramoto, et al., 1995; Zucker, 1996)

CANAL DE CALCIO TIPO T.

Los canales tipo T se activan a potenciales negativos. Están involucrados en la generación de la actividad de marcapasos en neuronas y en el músculo cardiaco. La toxina selectiva kurtoxina bloquea este tipo de canal, además se ha reportado que estos canales son sensibles a bajas concentraciones de Ni^{2+} (Tsien, et al., 1991; Randall y Tsien, 1997)

CANAL DE CALCIO TIPO L.

Estos canales son sensibles a dihidropiridinas (DHPs) benzodiazepinas y calciseptina. Fueron los primeros canales de calcio descritos del tipo HVA. Estos canales se encuentran en el cuerpo celular de las neuronas, y dendritas proximales (Westenbroek, et al., 1998). Participan en la transmisión sináptica, sin embargo, han sido involucrados en la liberación peptídica de la neurohipófisis y en la liberación de adrenalina y noradrenalina de células cromafines de la médula adrenal (Lemos, et al., 1989).

CANAL DE CALCIO TIPO N.

Los canales de calcio tipo N son insensibles a DHPs pero son bloqueados por el péptido extraído del caracol marino *Conus geograus* llamada ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx-GVIA) (Boland, et al., 1994; Kamiya, et al., 1988; Lovinger, et al., 1994). Se ha

mostrado que estos canales intervienen en el proceso de liberación de neurotransmisor, ya que interactúan con la syntaxina (proteína membranal involucrada en la fusión de las vesículas que contienen el neurotransmisor) (Catterall, 1999).

CANAL DE CALCIO TIPO P/Q.

Los canales de calcio tipo P fueron descritos originalmente en neuronas cerebelares de Purkinge (Llinás, et al., 1989). Son resistentes a DHPs y a ω -CgTx-GVIA, pero son sensibles a la toxina ω -agatoxina IVA (ω -AgTx-IVA) (Kim, et al., 1995) y ω -agatoxina-TK (ω -AgTx-TK) (Teramoto, et al., 1995) a una concentración de 30 nM. Esta toxina es extraída del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. A concentraciones de más de 30 nM se bloquea el canal de calcio tipo Q, (descrito en las neuronas granulosas cerebelares) (Wheeler, et al., 1994).

La diferencia entre estos dos tipos de canales puede deberse a que exista cierta heterogeneidad en la subunidad α_{1A} por un empalme alternativo del gen α_{1A} (Bourinet, et al., 1999) o en las subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$, lo que les confiere diferentes propiedades farmacológicas.

CANAL DE CALCIO TIPO R.

En algunas neuronas del sistema nervioso central se ha descrito otro tipo de canal resistente a los bloqueadores para los tipos de canales descritos anteriormente y han sido clasificados como tipo R. Estos canales también han sido involucrados en la liberación de neurotransmisor (por ejemplo, glutamato) (Smith, et al., 1999).

Los canales de calcio están localizados en los cuerpos celulares, dendritas y en las terminales presinápticas (Catterall, 1999; Llinás y Moreno, 1998), por lo que se encuentran fuertemente involucrados en la liberación de neurotransmisor.

La modulación de los canales puede darse por diversos transmisores (Tsien et al, 1988), que pueden producir cambios en la corriente presináptica de Ca^{2+} , alterando la eficiencia de la transmisión sináptica (Grillner et al., 1995).

PEPTIDOS OPIOIDES

Los opioides endógenos, son péptidos que se sintetizan en diferentes tipos celulares y son derivados de tres distintas proteínas precursoras. Han sido clasificados en tres familias:

- a) encefalinas
- b) endorfinas
- c) dinorfinas

ENCEFALINAS

Las encefalinas son péptidos de diferentes tamaños, que derivan de la **Proencefalina A** (una proteína de 269 aminoácidos). Este precursor da origen a dos tipos de pentapéptidos (met-encefalina y leu-encefalina), cuatro tipos de met-encefalina y un tipo de leu-encefalina, un heptapéptido, un octapéptido y un péptido E. El péptido señal en el dominio N-terminal de esta proteína consta de 24 amino ácidos. (Simon y Hiller, 1994).

ENDORFINAS

Las endorfinas son originadas de la **Proopiomenlanocortina (POMC)**, una proteína de 267 aminoácidos, de la cual derivan diferentes tipos de endorfinas: α -, β -, y γ - endorfina, las cuales se diferencian en la cantidad de aminoácidos. El proceso post-traduccional para las diferentes proteínas es específico en cada tejido (Simon y Hiller, 1994).

DINORFINAS

Las dinorfinas son derivadas de la **prodinorfina (o proencefalina B)**, un péptido de 256 aminoácidos, es el precursor de α -neo-eudorfina, β -neo-endorfina, dinorfina A- (1-8), dinorfina A- (1-17) y dinorfina B también llamada rimorfina. (Tabla 1) (Simon y Hiller, 1994).

Precursor	Péptido	Estructura (a.a)
Proencefalina A	Met-encefalina	YGGFM
	Leu-encefalina	YGGFL
	Heptapéptido	YGGFMRF
	Octapéptido	YGGFMRGL
	Péptido E	YGGFLRRQFKV VTRSQQDPNAYYEELFDV
POMC	β -endorfina	YGGFLTSEKSQTPLVTLFKNAIIKKNAYKKGE
	α -endorfina	YGGFLTSEKSQTPLVT
	γ -endorfina	YGGFLTSEKSQTPLVTL
Prodinorfina	α -neo-endorfina	YGGFLRKYPK
	β -neo-endorfina	YGGFLRKYP
	Dinorfina A (1-17)	YGGFLRRIRPKLKWDNQ
	Dinorfina A (1-8)	YGGFLRRI
	Dinorfina B (1-29)	YGGFLRRQFKV VTRSQQDPNAYYEELFDV
	Dinorfina B (rimorfina)	YGGFLRRQFKV VT

(A) Ala; (D) Asp; (E) Glu; (F) Phe; (G) Gly; (H) His; (I) Ile; (K) Lys; (L) Leu; (M) Met; (N) Asn; (P) Pro; (Q) Gln; (R) Arg; (T) Thr; (S) Ser; (V) Val; (W) Trp; (Y) Tyr.

Tabla 1. Estructura de los diferentes péptidos endógenos. Los péptidos opioides muestran una secuencia común en la parte del NH₂ terminal. Todos son potentes opioides endógenos pero con distinto patrón de selectividad sobre los diferentes tipos de receptor (Tomado de Simon y Hiller, 1994).

DISTRIBUCIÓN DE LOS PÉPTIDOS OPIOIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Los péptidos opioides son abundantes en muchas regiones del sistema nervioso central (Cuello, 1978) como son, el hipocampo (Simmon y Chavkin, 1996), el neostriado (Graybiel, et al., 1981), el globo pálido externo, el globo pálido interno, el tálamo, y la corteza, donde juegan un papel muy importante en la neurotransmisión de áreas relacionadas con el dolor y la actividad locomotora. También se encuentran en el núcleo del tracto solitario, el núcleo arcuato; donde sus fibras proyectan hacia áreas preópticas, el núcleo paraventricular anterior y el locus coeruleus, bulbo, hipotálamo, amígdala, septum y médula espinal (Cuello, 1978).

Las drogas opioides (llamados opiáceos) y péptidos endógenos (opioides), han sido relacionadas con diferentes funciones como son: El control del dolor (Jaffe y Martin, 1990), mecanismos de estrés, la regulación respiratoria, el control de la temperatura, el comportamiento sexual, el sistema locomotor, la memoria, y el desarrollo de tolerancia y dependencia física. En el sistema endócrino están relacionados con el incremento en la liberación de hormona de crecimiento, ACTH, prolactina, y hormona antidiurética, disminución en los niveles de trirotropoyetina, hormona luteinizante y hormona folicestimulante. También se ha establecido que participan en la regulación de la liberación de diferentes neurotransmisores (Cuello, 1978). Además, en la respiración, la respuesta inmune, y la motilidad gastrointestinal (Pasternak, 1998).

RECEPTORES OPIOIDES.

La postulación de múltiples receptores a opioides coincidió en el tiempo con la identificación de los primeros opioides endógenos (Hughes, et al., 1975; Li y Chung, 1976). Las propiedades farmacológicas de sustancias sintéticas, y encefalinas naturales, en diferentes órganos sensibles a opioides, llevó a la conclusión de la

existencia de diferentes receptores (Lord, et al., 1977). La identificación de los tipos de receptor fue realizada por Martin y sus colaboradores en 1976, quienes propusieron la existencia tres tipos (Martin, et al., 1976). El nombre de los receptores se designó por el tipo de droga utilizada la cual era más afín para cada tipo de receptor: el receptor mu (μ por morfina), kappa (κ por ketociclazocina) y sigma (σ por SKF 10,047 o N-allylnormetazocine). Sin embargo, Mannalack y colaboradores en 1986 y Mussacchio en 1990 mostraron que este receptor no es de naturaleza opioide (Mannalack, et al., 1986; Mussacchio, 1990). Por otro lado, Kosterlitz en 1980 propuso un cuarto tipo de receptor llamado delta (δ) el cuál presenta características farmacológicas diferentes a los otros tipos de receptores. Se ha sugerido, que los péptidos endógenos se unen de forma preferencial a los receptores opioides (Tabla 2). De esta manera se han identificado y caracterizado farmacológicamente (Goldstein y James, 1984; Martin, 1984) los receptores opioides (μ , δ , κ), gracias a la utilización de agonistas y antagonistas selectivos (Dhawan, et al., 1996).

La IUPHAR (International Union of Pharmacology) ha sugerido que los nombres de los receptores se designen por orden de clonación con las letras OP (Opioid Peptide) de esta manera: OP₁ (δ), OP₂ (κ), OP₃ (μ), otra nomenclatura molecular es DOR (Delta Opioid Receptor) (δ), KOR (κ), MOR (μ), (Dhawan, et al., 1996). Por controversia en la nomenclatura se utiliza la nomenclatura farmacológica (Dhawan, et al., 1996).

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES A OPIACEOS.

La existencia de los receptores a opioides (μ , δ y κ) ha sido confirmada por medio de técnicas de clonación. Estos, se han identificado como miembros de la familia de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Evans, et al., 1992; Kieffer, et al., 1992; Kieffer, 1995). Se ha observado una notable homología en la estructura y número de aminoácidos de los receptores. El receptor δ tiene 372 a.a. mientras que μ tiene 398 a.a. y κ 380 a.a. (Dhawan, et al., 1996).

Los tres receptores tienen sitios de glucosilación cerca del extremo N-terminal el cual se encuentra en la cara externa de la membrana, mientras que la región C-terminal está en la cara interna de la membrana. La estructura es de siete segmentos transmembranales formando tres asas extracelulares y tres asas intracelulares (Strosberg, 1991). Los tres receptores poseen 65% de homología, así el 35% restante es lo que les confiere el tipo de selectividad. Las regiones que poseen mayor similitud son las regiones transmembranales (particularmente en la 2a y 3a región transmembranal) y las asas intracelulares. Mientras que las regiones divergentes son las asas extracelulares y las regiones del amino y carboxilo terminal (Reisine y Bell, 1993). Los tres receptores tienen residuos de aspartato cargados, considerados para funciones importantes. Existen sitios consenso para proteínas cinasas A y C, en la región del extremo C-terminal. También presentan una pequeña asa intracelular de 25 a.a. que es probable sitio de unión con la proteína G. (Dhawan, et al., 1996).

Investigaciones farmacológicas han sugerido la existencia de subtipos de receptores a opiáceos (Sato y Minami, 1995). Sin embargo, no se ha establecido sus bases moleculares.

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Ligando Opiode Endógeno Preferen.
δ	DPOPE (Try-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen)	Naltrindole	Encefalinas
	DSLET (Try-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr)	BNTX	
	DADLE (Try-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu)	S'NTII (Naltrindole 5'-isothiocyanate)	
	DPLPE (Try-D-Pen-Gly-Phe-L-Pen)		
μ	DAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol)	CTOP (D-Phe-Cys-Trp-D-Trp-Om-Thr-Pen-Thr-NH ₂)	β -endorfina
	Demorphin (Tyr-D ⁺ Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂)	CTAP (D-Phe-Cys-Tys-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH ₂)	
	FK 33-824 (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Met(o)-ol)		
K	Ketocyclazocine	U-69,593	Dinorfina
	Ethylketocyclazocine	ICI 187067	
	Bremazocine	U-62,066	

Tabla 2. Agonistas, antagonistas opiáceos y péptido opioide endógeno preferencial de los receptores opioides. (Modificado de Dhawan, et al., 1996).

RECEPTOR δ .

Los receptores δ han sido clonados de rata (Chen, et al., 1993a), ratón (Evans, et al., 1992) y humano (Knapp, et al., 1994) y han sido expresados en diferentes líneas celulares como NG108-15 (Evans, et al., 1992) neuroblastoma SH-SY5Y (Simonin, et al., 1994) y se ha mostrado que las secuencias de los receptores de rata y ratón son idénticas (Yasuda, et al., 1993). En tanto que la secuencia del receptor de

humano tiene una similitud de 94% con los receptores de rata y ratón (Knapp, et al., 1994; Simonin, 1994).

El gen δ de humano está constituido por tres exones (regiones codificantes para el receptor) y dos intrones (regiones no codificantes), entre el exón 2 y 3 se encuentra un intrón de 3-Kb (Simonin, et al 1994). La comparación de la organización del gen del ratón y el humano indican una variable en los límites intrón-exón en regiones sin traducción pero conservan las uniones con las secuencias codificantes. Otras diferencias parecen estar en las regiones terminales amino y carboxilo (Simonin, et al., 1994).

Existen dos modificaciones post-traduccionales; dos sitios de N-glicosilación en el amino terminal y cinco secuencias consenso que son sitios blanco de proteínas cinasas en la tercer asa intracelular y en la región citoplasmática (Simonin, et al., 1994).

RECEPTOR μ .

Los receptores μ han sido clonados de la rata (Chen, et al., 1993a) del humano (Wang, et al., 1993; 1994a) y ratón (Min, et al., 1994). Han sido expresados en líneas celulares COS (células de fibroblasto de mono) (Chen, et al., 1993a). Este receptor tiene mucha homología con el receptor δ . Presenta 5 residuos conservados de acido aspártico en los dominios II y III del receptor. Se piensa que estos residuos, interactúan con los grupos amino protonados de varios ligandos, también presentan dos residuos de cisteína los cuales se piensa están involucrados con grupos disulfuro de la primera y segunda asa intracelulares (Chen, et al., 1993a).

RECEPTOR κ .

El receptor κ ha sido clonado de ratón (Yasuda, et al., 1993) rata (Chen, et al., 1993b; Li, et al., 1993) y de humano (Wang, et al., 1994b), también ha sido expresado en líneas celulares COS.

La activación de los receptores a opioides, ya sea por péptidos opioides endógenos (β -endorfina, met-enkefalina y leu-enkefalina), o moléculas no peptídicas derivadas del opio (de la flor de la amapola), tales como la morfina (un alcaloide) o diversas sustancias sintéticas (North, 1986) participan en una gran variedad de procesos fisiológicos (Udenfriend y Meienhofer, 1984).

MODULACIÓN PRESINÁPTICA EN EL NEOESTRIADO.

Se han descrito, varios neuromoduladores, los cuales se ha mostrado que están involucrados en la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas que llegan al neostriado. Entre ellos están: el GABA, a través de la activación del receptor GABA_B (Barral et al., 2000), la adenosina mediante el receptor A_{2A} (Malenka y Kocsis, 1988) la dopamina mediante el receptor D₂, la acetilcolina mediante los receptores muscarínicos (Barral et al., 1999; Hernández-Echeagaray et al., 1998) y el glutamato por medio de los receptores metabotrópicos mGluR₁-mGluR₈ (Miller, 1998).

MODULACIÓN POR OPIÁCEOS EN EL NEOESTRIADO.

Los péptidos opioides endógenos como las enkefalinas y la dinorfina son abundantes en el neostriado (Gerfen, 1992; Graybiel, 1990; Yang et al., 1977). met- y leu-enkefalinas se encuentran en altas concentraciones en NEMs que proyectan al GPe (Cuello y Paxinos, 1978; Graybiel y Ragsdale, 1983). Las NEMs que contienen SP y dinorfina proyectan hacia la SNr (Anderson y Reiner, 1990). Esto sugiere que pueden tener un papel modulador y pueden influir en el control de la actividad neuronal, de esta manera pueden participar en la actividad motora (Hamel y Beaudet,

RECEPTOR κ .

El receptor κ ha sido clonado de ratón (Yasuda, et al., 1993) rata (Chen, et al., 1993b; Li, et al., 1993) y de humano (Wang, et al., 1994b), también ha sido expresado en líneas celulares COS.

La activación de los receptores a opioides, ya sea por péptidos opioides endógenos (β -endorfina, met-enkefalina y leu-enkefalina), o moléculas no peptídicas derivadas del opio (de la flor de la amapola), tales como la morfina (un alcaloide) o diversas sustancias sintéticas (North, 1986) participan en una gran variedad de procesos fisiológicos (Udenfriend y Meienhofer, 1984).

MODULACIÓN PRESINÁPTICA EN EL NEOESTRIADO.

Se han descrito, varios neuromoduladores, los cuales se ha mostrado que están involucrados en la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas que llegan al neostriado. Entre ellos están: el GABA, a través de la activación del receptor GABA_B (Barral et al., 2000), la adenosina mediante el receptor A_{2A} (Malenka y Kocsis, 1988) la dopamina mediante el receptor D₂, la acetilcolina mediante los receptores muscarínicos (Barral et al., 1999; Hernández-Echeagaray et al., 1998) y el glutamato por medio de los receptores metabotrópicos mGluR₁-mGluR₈ (Miller, 1998).

MODULACIÓN POR OPIÁCEOS EN EL NEOESTRIADO.

Los péptidos opioides endógenos como las enkefalinas y la dinorfina son abundantes en el neostriado (Gerfen, 1992; Graybiel, 1990; Yang et al., 1977). met- y leu-enkefalinas se encuentran en altas concentraciones en NEMs que proyectan al GPe (Cuello y Paxinos, 1978; Graybiel y Ragsdale, 1983). Las NEMs que contienen SP y dinorfina proyectan hacia la SNr (Anderson y Reiner, 1990). Esto sugiere que pueden tener un papel modulador y pueden influir en el control de la actividad neuronal, de esta manera pueden participar en la actividad motora (Hamel y Beaudet,

1987). Estos péptidos se encuentran distribuidos en el patrón de mosaico del neocórtico (Graybiel et al., 1981).

Los receptores a opiáceos se encuentran distribuidos de diferente manera en el NE. El receptor μ se observa inmerso en los parches (Hamel y Beaudet, 1987; Mansour, et al., 1987; Wang et al., 1996), mientras que los receptores δ (Graybiel y Ragsdale, 1983; Graybiel, 1990; Mansour, et al., 1987) y κ (Mansour, et al., 1987) se encuentran distribuidos en parches y matriz. Estudios previos, han mostrado que la activación de los diferentes tipos de receptores a opioides ejerce una modulación presináptica (Mulder et al., 1984; 1989; 1991; Raynor et al., 1994).

El mecanismo modulador por el cual los receptores a opiáceos ejercen su acción en las células, es a través de la activación de diferentes tipos de proteínas G/G₀ (Childers, 1991; Quock, et al., 1999; Standifer y Pasternak, 1997) que inhiben la activación de la adenilato ciclasa (Yasuda et al., 1993; Johnson et al., 1994; Raynor et al., 1994) y modulan las conductancias membranales de Ca²⁺ y de K⁺ (Childers, 1993). El incremento en las conductancias de K⁺ y la disminución de las de Ca²⁺ trae como consecuencia la inhibición del disparo y la reducción de la excitabilidad de la membrana, además de disminuir la liberación del transmisor (North, 1986; North, 1993).

Se ha mostrado que la activación de receptores δ en el neocórtico inhibe la liberación de acetilcolina (Mulder et al., 1984; 1989; 1991) y dopamina (Schlösser, et al., 1995), mientras que la activación del receptor κ también inhibe la liberación de dopamina en las terminales de las neuronas que llegan a este núcleo (Mulder et al., 1989; 1991; Schlösser, et al., 1995). También, otros estudios han sugerido que la activación de receptor κ en el estrado inhibe la liberación de glutamato provocado por altas concentraciones de K⁺ en sinaptosomas (Rawls, et al., 1999) y en rebanadas de estrado de ratón y primate (Hill y Brotchie, 1996) En rebanadas cerebrocorticales,

Nicol y sus colaboradores observaron la modulación de la liberación de glutamato por la activación de receptores μ y κ (Nicol, et al., 1996).

Estudios electrofisiológicos han mostrado que la activación de receptores μ y δ disminuye la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria por la reducción de la liberación de glutamato y GABA respectivamente de las terminales presinápticas (Jiang y North, 1992; Schlösser, et al., 1994).

Jiang y North en 1992, mostraron que la activación de los receptores μ y δ , inhiben la liberación de neurotransmisor excitatorio, glutamato, en las terminales corticoestriatales. Esto sugiere que la acción de los opioides es la inhibición presináptica de las entradas sinápticas excitatorias corticoestriatales (Jiang y North, 1992).

Al parecer, la activación de receptores μ y δ puede estar involucrada en la modulación presináptica de las entradas glutamatérgicas al neostriado. Sin embargo, esto no ha sido bien estudiado, ya que se ha visto que la activación de estos receptores en otras partes del cerebro inhibe la liberación de transmisor modulando la entrada de Ca^{2+} por los canales de calcio. En el neostriado se desconoce que tipo de canal o canales de calcio pueden estar siendo modulados por la activación de estos receptores. Por lo que el propósito del presente trabajo es:

OBJETIVOS

Describir en registro poblacional, la inhibición presináptica que ejerce la activación de receptores δ y μ a opiáceos en las sinapsis glutamatérgicas que llegan al neocórtex de la rata provenientes de la corteza cerebral.

Realizar la exploración experimental con el fin de determinar cual o cuales canales de calcio están involucrados en la modulación presináptica producida por la activación de receptores δ y μ .

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación

Se utilizan rebanadas de cerebro (cortes parasagitales) de rata macho de la cepa Wistar de 100 a 120 g. Se decapita al animal después de anestesiario con éter etílico. Se sumerge el cerebro en solución salina isotónica fría (a 4°C) compuesta de (en mM) 125.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃, 11.0 glucosa, gaseada continuamente con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂ con una osmolaridad de 300 mOsm por litro y un pH de 7.4. Se separan los hemisferios cerebrales y se colocan en un vibratomo (Series 1000) para la obtención de rebanadas sagitales de 400 μ m de espesor. Una vez obtenidas las rebanadas se mantienen en incubación con solución salina y gaseadas a temperatura ambiente por un período de 60 min. En estas condiciones es posible obtener registros confiables de más de 10 hr de duración sin un deterioro significativo de la preparación (Barral et al, 1999; Bargas et al, 1991, Flores-Hernández et al, 1997, Hernández-Echeagaray et al, 1998).

Para cada experimento las rebanadas se trasladan a la cámara de registro. El flujo constante de la solución salina es de 1 ± 0.5 ml/min a una temperatura constante de 32 ± 0.5 °C. Todos los fármacos que se utilizan en el presente trabajo se disuelven previamente en solución salina y se administran a través del dispositivo de superfusión.

EL POTENCIAL DE CAMPO.

Una de las herramientas electrofisiológicas utilizadas para estudiar las respuestas excitatorias en el neoestriado *in vitro*, es el registro del potencial de campo en la rebanada cerebral (Yamamoto, 1973).

Los potenciales de campo, son registros extracelulares de corrientes iónicas asociadas a la actividad de un grupo de neuronas. Las corrientes producen espigas poblacionales por la sumación de potenciales de acción (Andersen, et al, 1971). 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 (Johnston y Wu, 1995).

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

El potencial de acción registrado extracelularmente es una onda trifásica, dada por el cambio en la localización de los pozos y las fuentes de corriente activa. Al punto en el que las corrientes fluyen hacia el interior de la célula se le denomina pozo (son corrientes entrantes activas). Al punto por donde sale la corriente se le llama fuente (corrientes salientes). Por convención, en un registro extracelular una onda hacia abajo es negativa (-) y representa una corriente entrante mientras que una onda hacia arriba es positiva (+) y representa una corriente saliente, (Johnston y Wu, 1995) (figura 6).

Cuando se registra cerca de somas neuronales se observa una espiga difásica que consiste en una espiga negativa seguida por una fase positiva. Esto se debe a que el potencial de acción incluye una rápida despolarización de la membrana por

corrientes entrantes de Na^+ y una rápida despolarización por corrientes salientes de K^+ (Figura 7). El componente negativo corresponde a la despolarización de la membrana en el soma por el flujo de corriente extracelular que proviene de la membrana de las dendritas. La fase positiva corresponde a la reversión en el flujo de corriente extracelular por la rápida repolarización de la membrana del soma (Rall, W, 1992).

De esta manera a la neurona se le puede considerar como un dipolo eléctrico debido a que durante el pico del potencial de acción, en la membrana del soma se da una corriente activa (llamada pozo), y en las dendritas se da una corriente pasiva (llamada fuente), que cierra el circuito, por tanto las dendritas son positivas con respecto del soma.

Las aferentes sinápticas dan lugar a cambios en las corrientes. Esto es, las entradas sinápticas excitatorias en las dendritas apicales dan lugar a una corriente entrante (pozo), y en el soma a una corriente saliente pasiva (fuente). De esta manera podemos representar a las neuronas como dipolos donde se pueden medir las corrientes iónicas extracelulares de estos dipolos por el ángulo sólido cuyo vértice está en la punta del electrodo de registro, su valor depende del tamaño del dipolo y la distancia entre el punto de observación y el dipolo neuronal. El punto de observación puede ser positivo o negativo dependiendo de la posición con respecto al dipolo neuronal (Johnston y Wu, 1995).

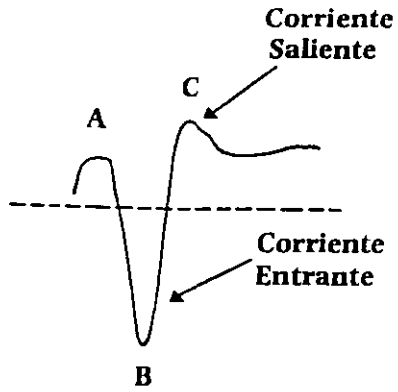


Figura 6. Potencial de acción registrado extracelularmente (Tomado de Johnston y Wu, 1995).

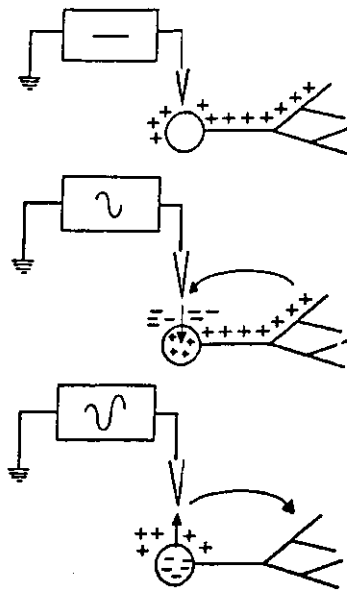


Figura 7. Registros durante el potencial de acción en el soma (Tomado de Toro, 1999).

POTENCIAL DE CAMPO EN EL NEOESTRIADO.

El neoestriado no presenta una estructura laminar (Malenka y Kocsis, 1988). Cuando se estimulan las fibras aferentes al neoestriado (corticoestriatales), el potencial de campo registrado, en este núcleo es una respuesta con dos negatividades, la primera (N_1) (Yamamoto, 1973) es la estimulación directa de los axones de las células intrínsecas, la segunda respuesta (N_2) representa el potencial de campo mediado sinápticamente (Malenka y Kocsis, 1988) (Figura 8).

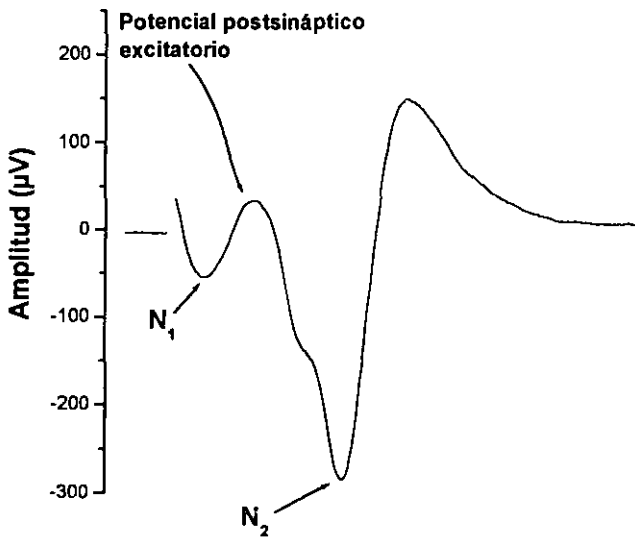


Figura 8. Potencial de campo en el NE. El componente N_1 se debe a la estimulación directa de los axones y células intrínsecas, donde el componente N_2 es la respuesta sináptica poblacional.

La respuesta sináptica (N_2) depende de Ca^{2+} ya que si se reduce la concentración de calcio extracelular o se aumenta el Mg^{2+} extracelular, este componente se ve reducido o abolido mientras que el componente N_1 , no se ve afectado. Sin embargo, si se aplica procaina, ambos componentes se ven afectados ya que se bloquean los canales de Na^+ dependientes de voltaje, los cuales son responsables de la generación del potencial de acción (Cordingley y Weight, 1986). Estos componentes también se ven afectados por la aplicación de tetrodotoxina (TTX) (Malenka y Kocsis, 1988).

SISTEMA DE ESTIMULACIÓN Y REGISTRO.

Los registros se obtienen estimulando las fibras aferentes al neocórtex (intensidad: 0-30 V; duración: 0.04 ms; frecuencia: 0.1 Hz), colocando electrodos bipolares concéntricos de 50 μ m de diámetro en la punta. Los estímulos se mandan con ayuda de un estimulador (Grass, S48), pasándolos a través de la unidad aisladora de estímulos (Digitimer, DS2A) en donde se regula la amplitud, duración y frecuencia de los mismos con un intervalo interestímulo de 20 ms.

Para la obtención de los potenciales de campo se utilizan técnicas convencionales de amplificación y registro: se utilizan electrodos de vidrio fabricados a partir de capilares de borosilicato (FHC) de 1.0 mm de diámetro; con una resistencia en la punta de 2 a 4 $M\Omega$, llenos de NaCl al 0.9 % como conductor. El potencial de campo se amplifica (Grass, P15), y se despliega en el osciloscopio (Hitachi, Modelo VC-6045A), se digitaliza (Instrutech VR-10B) y almacena en cintas de video (VHS). El software que se utiliza para desplegar los potenciales de campo en la computadora es el Lab-View (National Instruments, Versión 4.0 para Windows); y se utiliza el Sigma-Plot (Jandel Corporation, versión; 3.01 para Windows), así como el Microcal Origin (Microcal Software, versión; 4.0 para Windows) para el análisis de los registros.

PROTOCOLO DE FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO.

Para evaluar los eventos presinápticos se han empleado técnicas electrofisiológicas indirectas, uno de ellos es el protocolo de facilitación por pulsos pareados (FPP). Consiste en mandar un par de estímulos con un intervalo de tiempo de 20 ms entre el primero y el segundo estímulo. La primera respuesta al primer estímulo es el componente S_1 y la segunda respuesta el S_2 (Dunwiddie y Hass, 1985; Hernández-Echeagaray, 1998; Barral et al., 1999; 2000). Cuando las fibras aferentes son estimuladas a intervalos interestímulo cortos (20-60 ms) la respuesta de la segunda espiga poblacional (S_2) se ve facilitada (aumenta su amplitud) con relación a la primera (S_1), dependiendo de la intensidad de estimulación. La facilitación se explica con la hipótesis del calcio residual propuesta por Katz y Miledi (Katz y Miledi, 1967; 1970; Kamiya y Zucker, 1994). Dicha hipótesis postula que el incremento de calcio en la terminal debido a la apertura de los canales de calcio después de la llegada de un potencial de acción, o un estímulo despolarizante, persiste por un periodo breve de tiempo, de modo que el aumento en la concentración de calcio por la llegada de otro estímulo se suma al calcio ya existente, lo que provoca una mayor liberación del neurotransmisor (Katz y Miledi, 1970) durante el segundo estímulo.

La liberación del neurotransmisor depende de la concentración de calcio externo de una manera no lineal. Los iones calcio actúan de manera cooperativa para causar la liberación de un cuanto de neurotransmisor (Dodge y Rahamimoff, 1967; Hubbard, et al., 1968; Katz y Miledi, 1970).

El modelo para explicar la liberación en términos cuantitativos es el siguiente:

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

donde k es una constante y el (Ca^{2+}) representa la concentración de los iones de calcio externo (Magleby, 1987).

La elevación del nivel de Ca^{2+} en la terminal presináptica, a concentraciones submicromolares persiste por varios segundos después de un tren de potenciales de acción. Sin embargo, la liberación del neurotransmisor dura menos de 1 ms (Barrett y Stevens, 1972). Esta discrepancia cinética puede ser entendida si se asume que la concentración local de Ca^{2+} intracelular se incrementa durante una estimulación sucesiva, alcanzando niveles micromolares para la liberación del neurotransmisor (Zucker, 1989; Adler, et al., 1991).

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

Puesto que la relación entre la entrada de calcio en la terminal y la respuesta sináptica no es lineal, el efecto del calcio residual se incrementa cuando la concentración de Ca^{2+} externa es menor (0.5 mM) a la fisiológica (1.8 mM) o cuando se reduce la probabilidad de liberación por incremento de la relación $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{Ca}^{2+}]$ (Manabe, et al., 1993). La amplitud de la segunda espiga poblacional (S_2) se hace mucho mayor que la primera (S_1), ya que la probabilidad de que el segundo potencial de acción presináptico libere al transmisor es más grande debido al efecto del Ca^{2+} residual (Del Castillo y Katz 1954; Katz y Miledi 1968; Dunwiddie y Hass, 1985).

En un medio con alto Ca^{2+} extracelular (4 mM) aumenta la liberación del neurotransmisor con el primer estímulo (la amplitud de S_1 aumenta) pero posteriormente ocasiona depresión de la segunda respuesta (S_2 disminuye) (Debanne, et al., 1996). Esto es ocasionado porque existe un almacén limitado de neurotransmisor el cual puede ser agotado con el primer estímulo si la probabilidad de liberación es alta (Zucker, 1989). Evento conocido como depresión por pulso pareado (DPP).

Oclusión Farmacológica.

De manera análoga a la disminución del Ca^{2+} externo, la activación de los receptores presinápticos como μ y δ , pueden incrementar la facilitación sináptica por la disminución de la entrada de Ca^{2+} en la terminal. Es por eso que el aumento en la facilitación es indicativo de inhibición presináptica (Wu y Saggau, 1997).

Los experimentos fueron realizados en presencia de bicuculina (10 μM) un bloqueador específico del receptor GABA_A , para eliminar el componente inhibitorio y obtener solo el componente glutamatergico (Bargas, et al., 1998b; Barral, et al., 1999; 2000).

Para identificar farmacológicamente que tipo de receptores se están activando, se emplearon péptidos específicos a estos receptores. DPDPE (Try-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen) agonista del receptor δ y DAMGO (Try-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol) agonista del receptor μ (Calcagneti, et al., 1988; Jiang y North, 1992). Se utilizaron antagonistas específicos a estos receptores: naltrindole (Fang, et al., 1994; Sofuoglu, et al., 1991; Yamamura, 1992;) para el receptor tipo δ y CTOP (D-Phe-Cys-Try-D-Trp-Om-Thr-Pen-Thr-NH₂) para el receptor tipo μ (Dhawan, et al., 1996).

Para determinar si los diferentes agonistas a opiáceos actúan sobre conductancias de Ca^{2+} en las terminales, planteamos utilizar experimentos de oclusión farmacológica utilizando toxinas peptídicas específicas contra los diferentes subtipos de canal de Ca^{2+} : ω -agatoxina-TK (producto del gen α_{1A}) y ω -conotoxina-GVIA para los canales producto del gen α_{1B} ; que son los que participan en la liberación del transmisor (Bargas et al., 1998b).

RESULTADOS

Para determinar la influencia del calcio sobre el potencial ortodrómico de campo, se realizaron experimentos a bajas y altas concentraciones de Ca^{2+} externo con el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP).

En la figura 9 se muestran registros de potencial de campo en el NE obtenidos a concentraciones de calcio normal (2 mM), bajo calcio (0.5 mM) y alto calcio (4 mM) (las barras horizontales indican el tiempo de superfusión de las concentraciones de calcio). En A se muestra el curso temporal de un experimento representativo donde la relación S_2/S_1 , es cercana a 1 en condiciones de calcio normal o control. Al disminuir la concentración de calcio externo ambas respuestas ortodrómicas (S_1 y S_2) disminuyen en amplitud (mostrado en B). Sin embargo, la facilitación se incrementa porque la segunda respuesta (S_2) es mucho más grande que la primera (S_1). La facilitación, que cursa con una caída en la amplitud de ambas respuestas indica una disminución en la probabilidad de la liberación de neurotransmisor (Manabe, et al., 1993).

Al incrementar la concentración de Ca^{2+} externo, se observa un incremento de la primera respuesta (S_1) y una disminución en la segunda respuesta (S_2) produciéndose una depresión sináptica. Lo que indica un aumento en la probabilidad de liberación (Canepari y Cherubini, 1998). A la derecha se muestran trazos representativos de cada fase experimental (n=4).

Esto indica que el potencial de campo puede detectar cambios presinápticos. Si los cambios fueran postsinápticos ambas respuestas cambiarán sin modificar la relación S_2/S_1 . (Dunwiddie y Hass, 1985; Hernández-Echeagaray, et al., 1998; Barral, et al., 1999). De esta manera, podemos determinar el efecto de la activación de los receptores a opioides en las terminales presinápticas corticoestriatales.

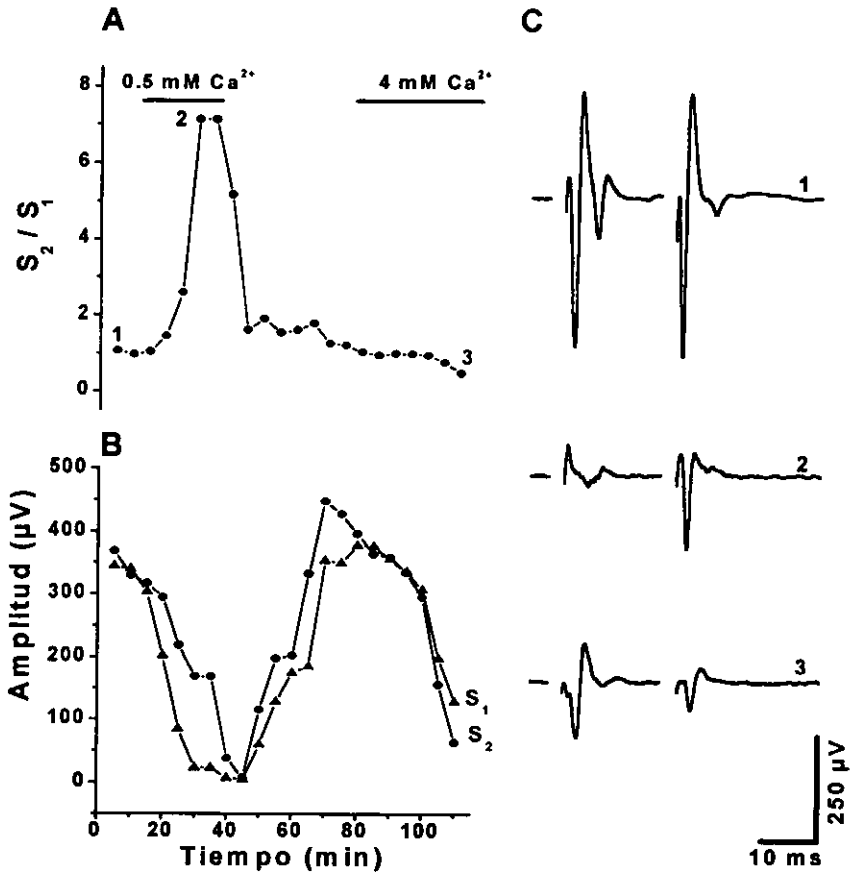


Figura 9. Efecto de la concentración Ca²⁺ externo sobre el potencial de campo en el NE. (A) Curso temporal de la relación S_2/S_1 . Las barras superiores indican el tiempo de exposición a las concentraciones de bajo y alto Ca²⁺. Observe el incremento en la facilitación en 0.5 mM de Ca²⁺ por la disminución del componente S_1 . En B se muestra el cambio de las amplitudes de S_2 (●) y S_1 (▲). En C se observan trazos representativos numerados en el curso temporal (n=4).

EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR δ .

Para determinar si la activación de receptores δ produce inhibición presináptica en las terminales glutamatérgicas se utilizó DPDPE, agonista del receptor δ (Jiang y North, 1992). El efecto de DPDPE fué bloqueado por naltrindole, antagonista selectivo de receptor δ (Yamamura, et al., 1992).

La figura 10 muestra el efecto de DPDPE sobre la FPP. En A se observa el cambio en la facilitación sináptica con respecto al tiempo. Inicialmente la facilitación en condiciones control es ajustada a para obtener una relación $S_2/S_1 \approx 1$. La aplicación de naltrindole (1 nM) provoca una pequeña disminución en la facilitación (ligera depresión) respecto del control. Esto sugiere un bloqueo del efecto de los opiáceos endógenos. La administración de DPDPE (1 μ M) en presencia de naltrindole no produce cambios en la facilitación; lo que indica que el antagonista está bloqueando el efecto del agonista. Sin embargo, al lavar el naltrindole y dejar el DPDPE, se observa un incremento en la facilitación del 73 ± 15 % respecto del control (obsérvese la reducción del componente ortodrómico S_1 y la permanencia del segundo S_2 en C3). Esto sugiere la activación de receptores tipo δ en las terminales corticoestriatales, produciendo inhibición presináptica (Jiang y North, 1992). El efecto es reversible si lavamos del medio el agonista (puede observarse la recuperación del componente S_1 en C. Una segunda aplicación de DPDPE produce el mismo efecto, aunque puede observarse desensibilización ante la aplicación continua ($n=10$, $p < 0.001$; prueba de t de Student).

En B, se muestra el curso temporal del cambio en las amplitudes (μ V) de ambas respuestas (S_2 y S_1) por separado. En el lado derecho se observan registros representativos de los puntos señalados en el curso temporal de A.

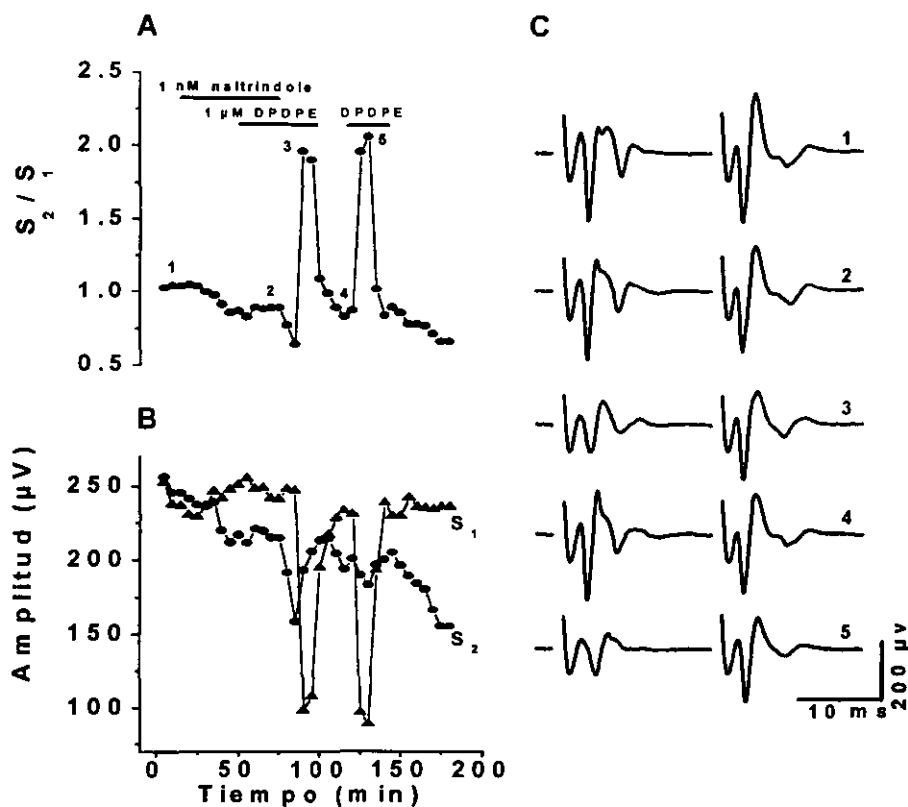


Figura 10. Efecto de DPDPE y bloqueo por el antagonista selectivo naltrindole. Curso temporal de un experimento representativo. La FPP es ajustada para obtener una relación S_2/S_1 cercana a 1 en condiciones control. Las barras horizontales indican el tiempo de superfusión. (A) El efecto de DPDPE (1 μ M) sobre la relación S_2/S_1 se ve bloqueado en presencia de naltrindole (1 nM). Una vez que se lava el antagonista se observa un incremento en la relación S_2/S_1 por efecto de DPDPE indicando inhibición presináptica ($n=10$, $p < 0.001$; t de Student). Este efecto puede ser revertido cuando es retirado de la superfusión. Una nueva aplicación de DPDPE produce nuevamente el efecto. Note se la desensibilización de la respuesta ante la presencia continua de DPDPE. (B) Cambio en la amplitud de las respuestas ortodrómicas S_2 y S_1 (μ V). (C) Registros representativos mostrados en el curso temporal. Nótese que el componente N_1 (antidrómico) no sufre ningún cambio indicando que no hay efecto postsináptico.

EFFECTO DEL BLOQUEO DE DIFERENTES TIPOS DE CANAL DE Ca^{2+} SOBRE LA ACCIÓN DEL RECEPTOR δ .

Diversas investigaciones han mostrado que los canales de calcio tipos N, P/Q y R participan en la liberación de neurotransmisor en diferentes terminales (Wheeler, et al., 1994), incluyendo las aferentes corticoestriatales (Bargas, et al., 1998b; Barral, 1999; 2000), y que estos canales pueden ser modulados por la activación de diferentes tipos de receptor (Barral et al., 1999; Barral et al., 2000; Hernández-Echeagaray et al., 1998; Malenka y Kocsis, 1988; Miller, 1998).

Para determinar si algún tipo de canal o canales de calcio pueden ser modulados por la activación del receptor δ a opiáceos, se probó el efecto de DPDPE en presencia de bloqueadores específicos de los diferentes tipos de canal de calcio.

Si las acciones de DPDPE están mediadas por la modulación de algún canal de Ca^{2+} , el bloqueo de este canal deberá ocluir la acción del DPDPE.

EFFECTO DEL DPDPE EN PRESENCIA DE ω -CgTx-GVIA.

Así, para determinar si los canales de calcio de tipo N son modulados por la activación del receptor δ , se utilizó ω -conotoxina-GVIA (ω -CgTx-GVIA) a la concentración de $1\mu M$.

En la figura 11 se muestra el efecto de DPDPE en presencia de ω -CgTx-GVIA. En A se observa el curso temporal de la relación S_2/S_1 en diferentes fases experimentales. El bloqueo de los canales de calcio tipo N por la aplicación de ω -CgTx-GVIA ($1\mu M$) produce un incremento en la FPP de un $67 \pm 10\%$ respecto al control, lo que indica que los canales de calcio tipo N están participando en la liberación del neurotransmisor pues su bloqueo produce inhibición presináptica. Una vez bloqueados los canales de calcio tipo N, se ajusta la relación S_2/S_1 a condiciones cercanas al control (≈ 1.0) incrementando la intensidad del estímulo. Esto, con la finalidad de reclutar más fibras y aumentar la participación de los canales de calcio no

bloqueados. Para determinar si la activación del receptor δ todavía modula la liberación de transmisor se adicionó el DPDPE (1 μ M) en presencia de ω -CgTx-GVIA. La acción del DPDPE incrementó la FPP a pesar del bloqueo de los canales de calcio tipo N. La relación S_2/S_1 aumentó un $95 \pm 44\%$ respecto al control por la activación del receptor δ ($n=4$, $p < 0.01$; U de Mann-Whitney). Por tanto, se puede observar que se sigue produciendo inhibición presináptica por efecto de DPDPE a pesar de estar bloqueado el canal N. Los resultados anteriores sugieren que la activación del receptor tipo δ no está modulando la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo N.

El cambio en la amplitud de los componentes sinápticos S_2 y S_1 respecto al tiempo se muestra en B. Observe la disminución en amplitud de S_1 y el mantenimiento de S_2 . A la derecha se observan trazos del efecto de ω -CgTx-GVIA sola y en presencia de DPDPE.

EFECTO DE DPDPE EN PRESENCIA DE ω -AgTx-TK.

Para investigar la posible modulación de los canales de calcio tipo P por la activación del receptor δ a opiáceos, se utilizó ω -agatoxina-TK (ω -AgTx-TK) a una concentración de 30 nM que es suficiente para bloquear la mayoría de estos canales. En la figura 12A se observa el incremento de la relación S_2/S_1 por el bloqueo de canales tipo P de un $26 \pm 6\%$. De manera similar al experimento anterior, una vez bloqueados los canales tipo P, se incrementa el voltaje para recuperar una facilitación cercana a los valores control. Al agregar DPDPE (1 μ M) en presencia ω -AgTx-TK se observa un incremento en la FPP en un $59 \pm 17\%$ por la activación del receptor δ ($n=4$, $p < 0.001$; U de Mann-Whitney). Por lo que 30 nM de ω -AgTx-TK no ocluyó el efecto de DPDPE. La activación del receptor δ produce nuevamente inhibición presináptica a pesar del bloqueo de los canales de calcio tipo P. Lo que muestra que

la activación del receptor δ no modula la entrada de calcio a través de los canales tipo P.

En B se muestra el cambio de las amplitudes (μV) de los potenciales poblacionales (S_2 y S_1). A la derecha se muestran trazos representativos de cada fase experimental.

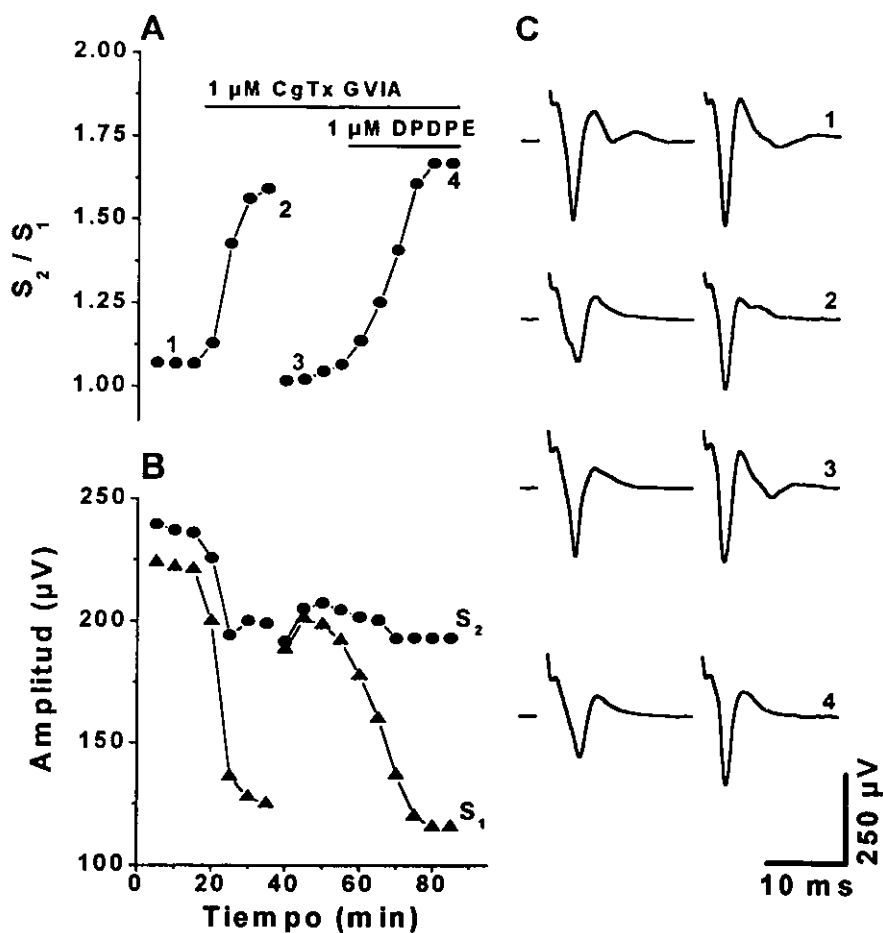


Figura 11. Efecto de DPDPE en presencia de ω -CgTx-GVIA. (A) Curso temporal de la acción de 1 μM de DPDPE en presencia de 1 μM de ω -CgTx-GVIA. Una vez ajustada la relación $S_2/S_1 \approx 1$ por el incremento de voltaje, la administración de DPDPE en presencia de la toxina incrementa la FPP a pesar del bloqueo de los canales tipo N ($n=4$, $p < 0.01$; U de Mann-Whitney). (B) Cambio en la amplitud de las respuestas sinápticas (S_2 y S_1) respecto al tiempo. Los registros de la derecha representan un punto de la gráfica de la izquierda.

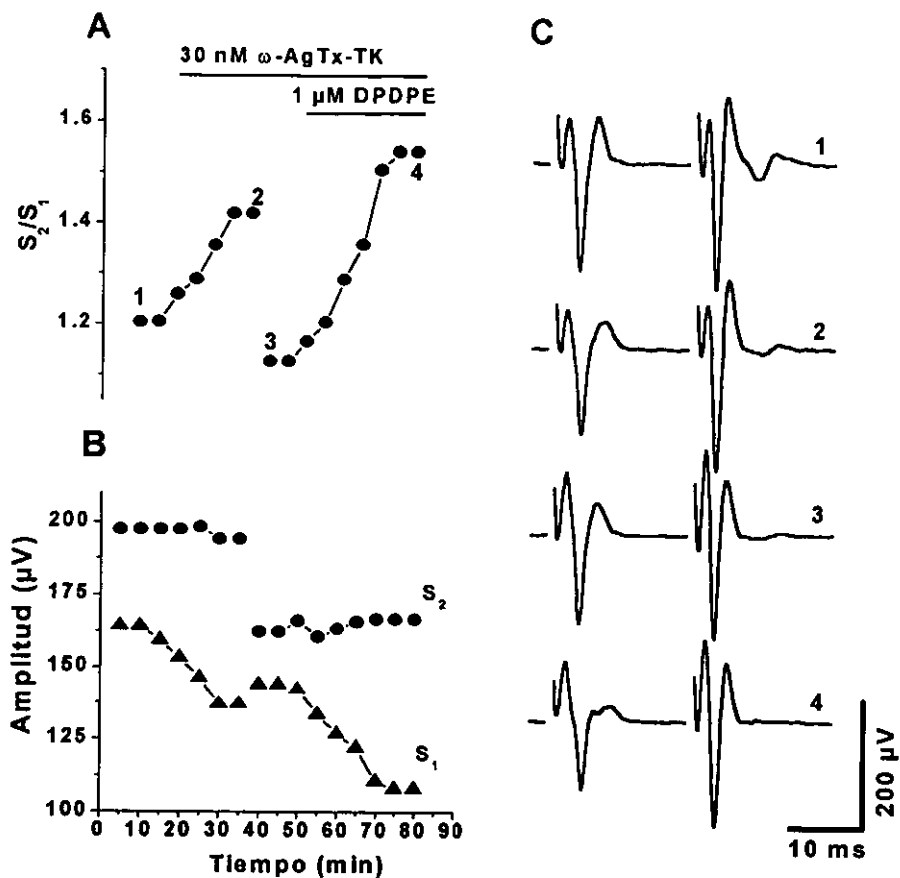


Figura 12. Efecto de DPDPE en presencia de ω -AgTx-TK. Bajas concentraciones de ω -AgTx-TK (30 nM), suficiente para bloquear significativamente los canales de calcio tipo P, no ocluyen el efecto de DPDPE (1 μ M). La FPP se incrementa significativamente con DPDPE (n=4, p < 0.001; U de Mann-Whitney). Observese el cambio en amplitud de S_1 en C por efecto del agonista.

Altas concentraciones de ω -AgTx-TK (400 nM a 1 μ M) bloquean los canales de calcio tipo Q. En neuronas corticales de rata, se ha reportado farmacológicamente la existencia de dos tipos de canal tipo Q, uno bloqueado a concentraciones de 1 μ M de manera parcialmente reversible en un 33% y otro bloqueado de manera irreversible (Teramoto, et al., 1997).

Como se observa en la figura 13A, la aplicación de ω -AgTx-TK (400 nM) incrementó la FPP en un 90% debido al bloqueo de los canales tipo P y Q. Sin embargo, en presencia de la toxina el efecto de DPDPE sigue presentandose. Este incremento en la facilitación por DPDPE ($30 \pm 5\%$) es significativo ($n=4$, $p < 0.05$ U de Mann-Whitney) por lo tanto, el efecto del receptor δ sobre la presinapsis no está dado a través del canal de calcio tipo P/Q. Esto es, aunque se observó una tendencia de la FPP a ser menor que en 11A y 12A, esta no resultó significativa respecto de estos grupos (ANOVA). Así es que aunque pueda haber cierta modulación de los canales Q, esta no explica la inhibición presináptica por DPDPE.

En 13B se observa el cambio en la amplitud de las respuestas sinápticas S_2 y S_1 con respecto al tiempo. En C se observan trazos representativos del experimento mostrado en A, de cada fase experimental indicada con números.

La tabla 3 muestra un resumen de los experimentos anteriores expresados en el incremento de la acción de DPDPE y en presencia de las toxinas bloqueadoras de los diferentes tipos de canal de calcio. Se puede observar que en presencia de ω -CgTx-GVA (1 μ M) y ω -AgTx-TK (30 y 400 nM) no ocluyen la acción de DPDPE. Los resultados sugieren que ninguno de los canales de Ca^{2+} presinápticos provados (N, P y Q) participan en la modulación de neurotransmisor debida a la activación de los receptores tipo δ a opiáceos.

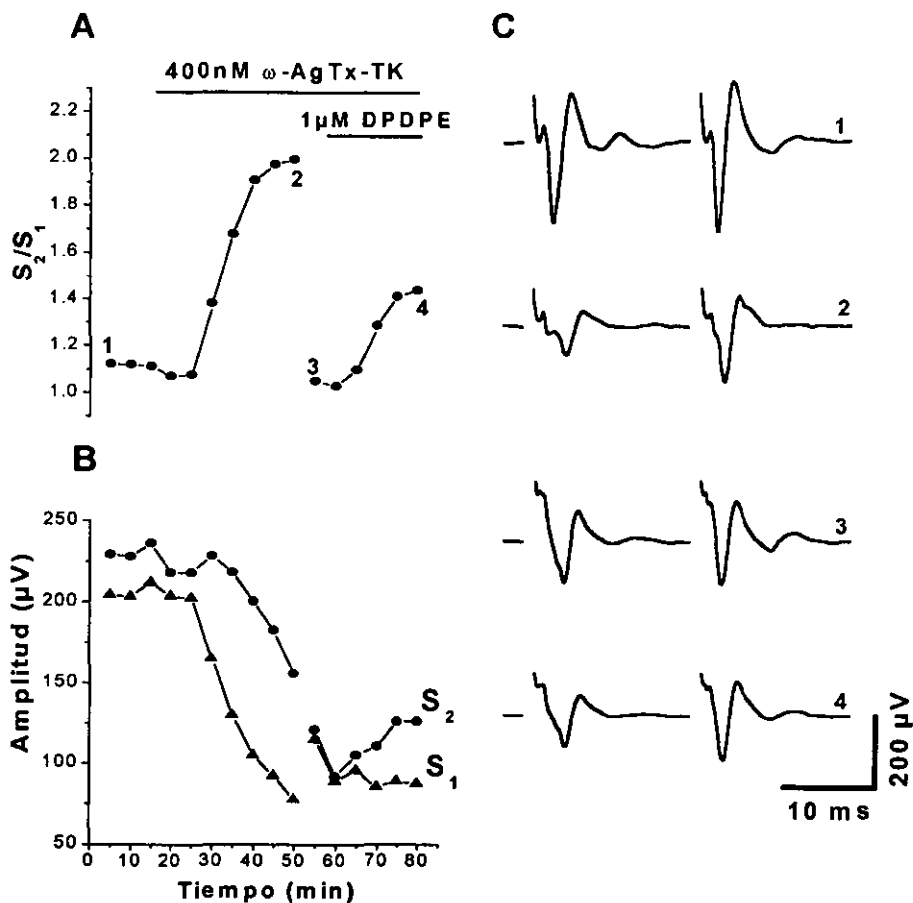


Figura 13. Efecto de DPDPE en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM). En A se observa que después del incremento de voltaje para recuperar la facilitación (≈ 1) en presencia de ω -AgTx-TK, el DPDPE sigue haciendo efecto produciendo inhibición presináptica estadísticamente significativa ($n=4$, $p < 0.05$; U de Mann-Whitney). Altas concentraciones de ω -AgTx-TK (400 nM) para bloquear los canales tipo Q no ocuyen entonces el efecto de DPDPE. Por lo tanto, se observa que la activación del receptor δ no modula la entrada de calcio a través de los canales tipo P/Q de manera significativa.

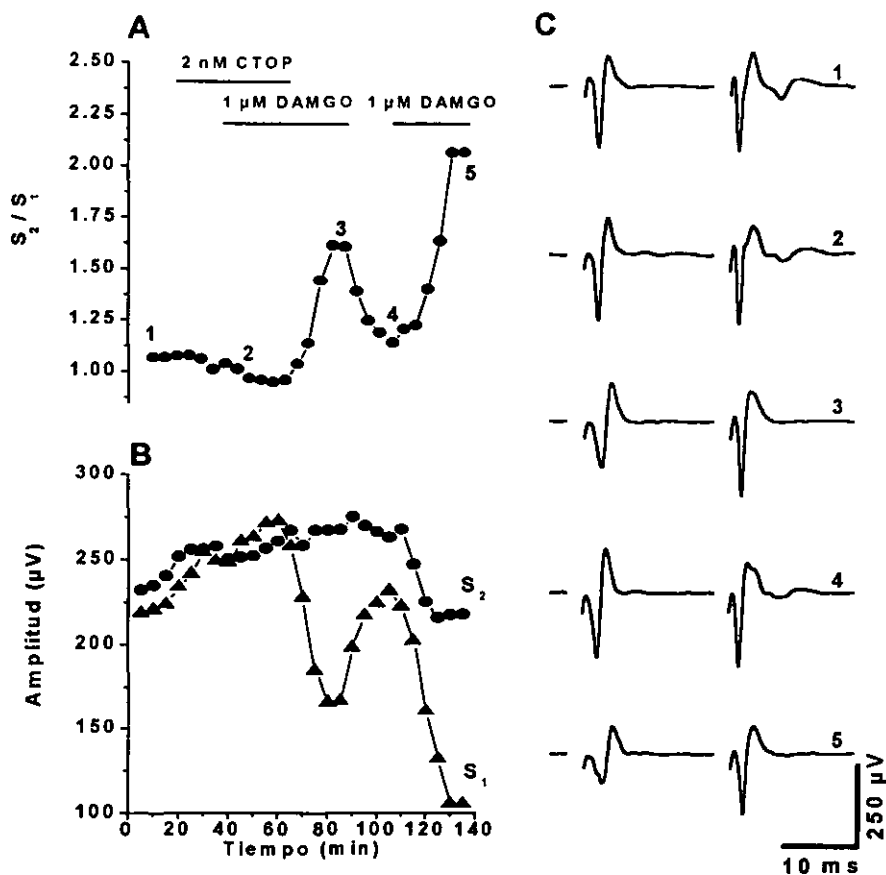
	Control	DPDPE 1 μ M.	ω -CgTx-GVIA 1 μ M +DPDPE	ω -AgTx-TK 30 nM +DPDPE	ω -AgTx-TK 400 nM + DPDPE
Media	1.088	1.738	1.951	1.594	1.405
Mediana	1.058	1.512	1.670	1.508	1.405
E.E.	0.045	0.155	0.027	0.176	0.033
D.S.	0.165	0.580	0.444	0.392	0.046
Significancia del efecto de DPDPE		p < 0.001 n=10, T	p < 0.01 n=4, U de M-W.	p < 0.001 n=4 U de M-W.	p < 0.05 n=4, U de M-W.

Tabla 3. Resumen de los experimentos anteriores donde se observa el efecto de DPDPE solo y en presencia de las toxinas bloqueadoras de los canales de Ca^{2+} . Obsérvese que en presencia de 400 nM de ω -AgTx-TK el DPDPE sigue haciendo efecto sobre la FPP. No hubo diferencias significativas entre los grupos con toxina (cols 4,5,6) (Anova & Kruskal-Wallis).

EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR μ .

De manera similar a la activación del receptor δ a opiáceos, se investigó la activación de los receptores tipo μ a opiáceos en las sinápsis corticoestriatales. La acción de 1 μ M DAMGO (agonista del receptor μ) sobre la FPP se muestra en la figura 14. Los trazos de la derecha representan cada uno de los puntos señalados con números (14C) en el curso temporal del experimento, a la izquierda (14A) la aplicación de 2 nM de CTOP produce una pequeña disminución de la facilitación ($9 \pm 0.01\%$) posiblemente por el bloqueo de los opiáceos endógenos. La aplicación de DAMGO en presencia de CTOP no produce cambio significativo en FPP. Al quitar del baño el antagonista y dejar al agonista, se observa un incremento en la facilitación sináptica de un $56 \pm 8\%$ respecto del control ($n=10$, $p < 0.001$; prueba de t de Student) (observe la disminución en la amplitud del primer componente ortodrómico S_1

mientras que el componente ortodrómico S_2 no muestra cambio notable en su amplitud). La facilitación se recupera a condiciones cercanas al control (≈ 1) si se lava del medio de superfusión el agonista. Una aplicación posterior de DAMGO incrementa la relación S_2/S_1 mostrando nuevamente el efecto. En B se muestra el cambio de las amplitudes de los potenciales sinápticos poblacionales. Trazos representativos se muestran en C. Los resultados anteriores sugieren una inhibición presináptica por la activación de receptores tipo μ que están modulando la liberación de neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales (Jiang y North, 1992).



Gráfica 14. Efecto del agonista selectivo DAMGO sobre la FPP y su bloqueo por la presencia del antagonista selectivo CTOP. (A) Nótese: 1 y 2. el efecto de CTOP solo y en presencia de DAMGO, donde no se observa cambio en la facilitación sináptica, 3. el incremento en la facilitación por la acción de DAMGO ($n=10$, $p < 0.001$; prueba de t de Student). 4. el efecto es reversible si se lava el agonista, 5. una nueva aplicación de DAMGO muestra nuevamente la respuesta. (B) Cambio de las respuestas S_2 y S_1 respecto del tiempo. (C) Trazos representativos del curso temporal del experimento.

EFFECTO DEL BLOQUEO DE DIFERENTES TIPOS DE CANAL DE Ca^{2+} SOBRE LA ACCIÓN DEL RECEPTOR μ .

Para determinar si los canales de calcio son modulados por la activación del receptor tipo μ se investigó el efecto del agonista selectivo DAMGO en presencia de las toxinas bloqueadoras de los canales de calcio.

EFFECTO DE DAMGO EN PRESENCIA DE ω -CgTx-GVIA.

En la figura 15 se observa el efecto de DAMGO (1 μM) en presencia de ω -CgTx-GVIA (1 μM). En A, la aplicación de ω -CgTx-GVIA bloquea la entrada de calcio a través de los canales N, por lo que se observa un incremento en la FPP. De manera similar a los experimentos anteriores, se incrementó la intensidad del estímulo para reclutar más fibras, aumentar la participación de canales no bloqueados y disminuir la facilitación a valores cercanos al control. Al agregar DAMGO en presencia de la toxina, se observó un incremento en la facilitación de un $53 \pm 19\%$ ($n=4$, $p < 0.05$; U de Mann-Whitney). Esto muestra que el efecto de DAMGO no es ocluido por ω -CgTx-GVIA ya que la activación del receptor tipo μ produjo un incremento en la FPP lo que sugiere una inhibición presináptica. De manera similar al receptor δ , el receptor tipo μ no está modulando la entrada de calcio a través del canal tipo N. Por lo que se descarta la participación de los canales tipo N en la modulación por opiáceos de la liberación de neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas. El cambio de las amplitudes (μV) de los potenciales sinápticos poblacionales (S_2 y S_1) se observa por separado en B. Trazos representativos de cada fase experimental se muestran a la derecha.

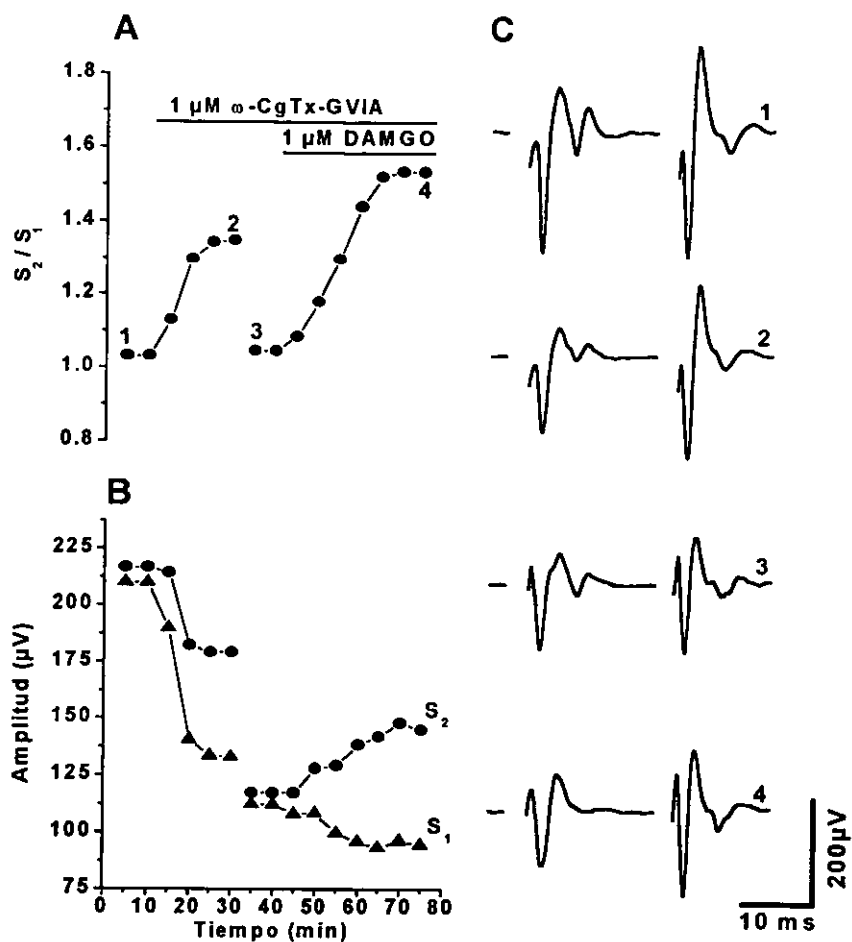


Figura 15. Efecto de DAMGO en presencia de ω -CgTx-GVIA. (A) Curso temporal de un experimento representativo que muestra el aumento de la FPP (S_2/S_1) por 1 μ M de ω -CgTx-GVIA. Después de ajustar la relación S_2/S_1 a condición cercana al control, la adición de DAMGO 1 μ M sigue produciendo un aumento en la facilitación ($n=4$, $p < 0.05$; U de Mann-Whitney). (B) Cambio de las amplitudes de las respuestas sinápticas. (C) Registros representativos de cada punto señalado en el curso temporal.

EFFECTO DE DAMGO EN PRESENCIA DE ω -AgTx-TK.

El efecto de DAMGO a pesar del bloqueo de los canales tipo P se muestra en la figura 16. La aplicación de DAMGO (1 μ M) en presencia de 30 nM de ω -AgTx-TK (indicado por las barras superiores), produce un incremento en la FPP de un $63 \pm 13\%$. Lo que muestra que el efecto de DAMGO no es ocluido por la toxina. Observe el efecto sobre el bloqueo de los canales de calcio tipo P. Los resultados sugieren que la activación del receptor tipo μ no modula la entrada de calcio a través de los canales tipo P. Se muestra en B el cambio en las amplitudes de S_2 y S_1 con respecto al tiempo. A la derecha se muestran trazos representativos.

La figura 17 muestra el efecto de DAMGO en presencia de 400 nM de ω -AgTx-TK para bloquear la entrada de calcio a través de los canales tipo P y Q. Tal concentración ω -AgTx-TK no ocluyó completamente el efecto de DAMGO. Se puede observar un incremento en la FPP ($43 \pm 14\%$) por el efecto de DAMGO ($n=4$, N.S; U de Mann-Whitney). Sin embargo, no hay diferencias significativas respecto del control. Estos resultados muestran que aunque hay una tendencia a la disminución del efecto de DAMGO, esta no es significativa. Esto es, el efecto de DAMGO no puede explicar la modulación de los canales P/Q.

Abajo (B) se muestra el cambio en las amplitudes de las respuestas sinápticas con respecto al tiempo. A la derecha los trazos representativos señalados con número del curso temporal del experimento.

En la tabla 4 se observa el resumen de los experimentos anteriores. Se compara el efecto de DAMGO solo y en presencia de las toxinas de los diferentes tipos de canal de calcio. La ω -CgTx-GVIA (1 μ M) y la ω -AgTx-TK (30 y 400 nM), no ocluyen el efecto de DAMGO. Esto muestra que los canales de calcio tipo N y P/Q no median la acción presináptica dada por la activación del receptor μ .

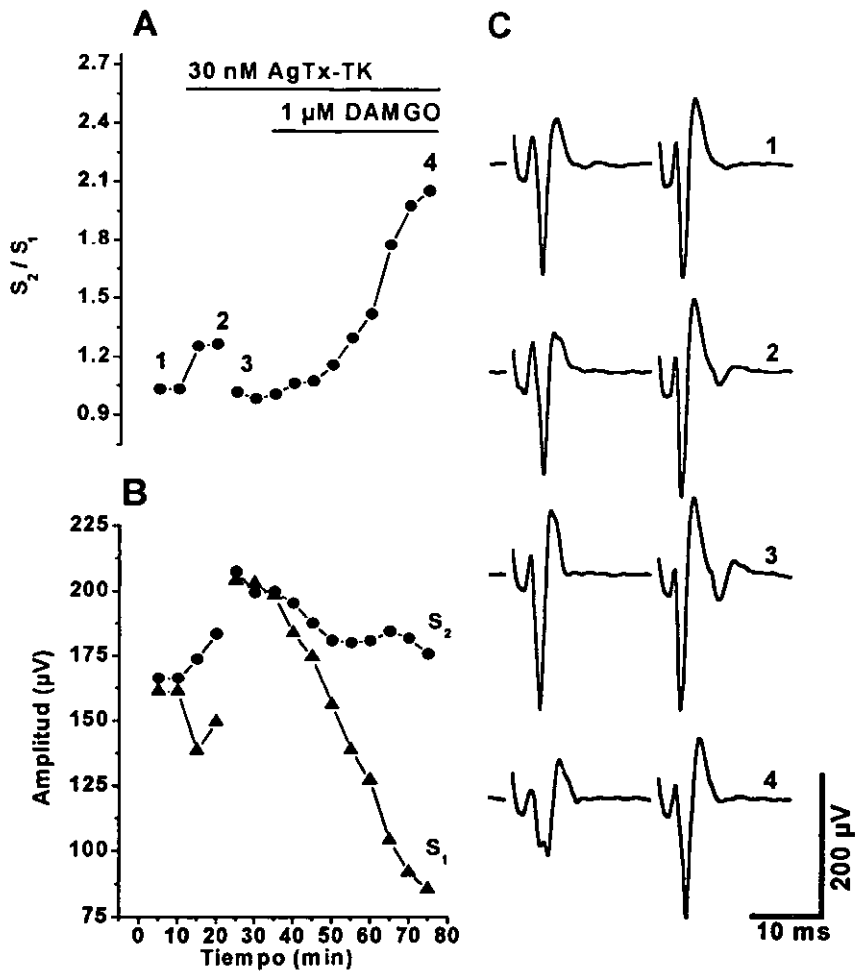


Figura 16. Efecto de DAMGO en presencia de ω -AgTx-TK. (A) 30 nM de ω -AgTx-TK incrementan la FPP. Al agregar DAMGO 1 μM en presencia de la toxina, la FPP se incrementa significativamente ($n=4$, $p < 0.05$; U de Mann-Whitney). El efecto de ω -AgTx-TK no ocluye la acción del agonista. Esto muestra que los canales de calcio tipo P no son modulados por la activación del receptor tipo μ . (B) Cambio en amplitud de ambos componentes sinápticos. (C) Trazos de cada fase experimental.

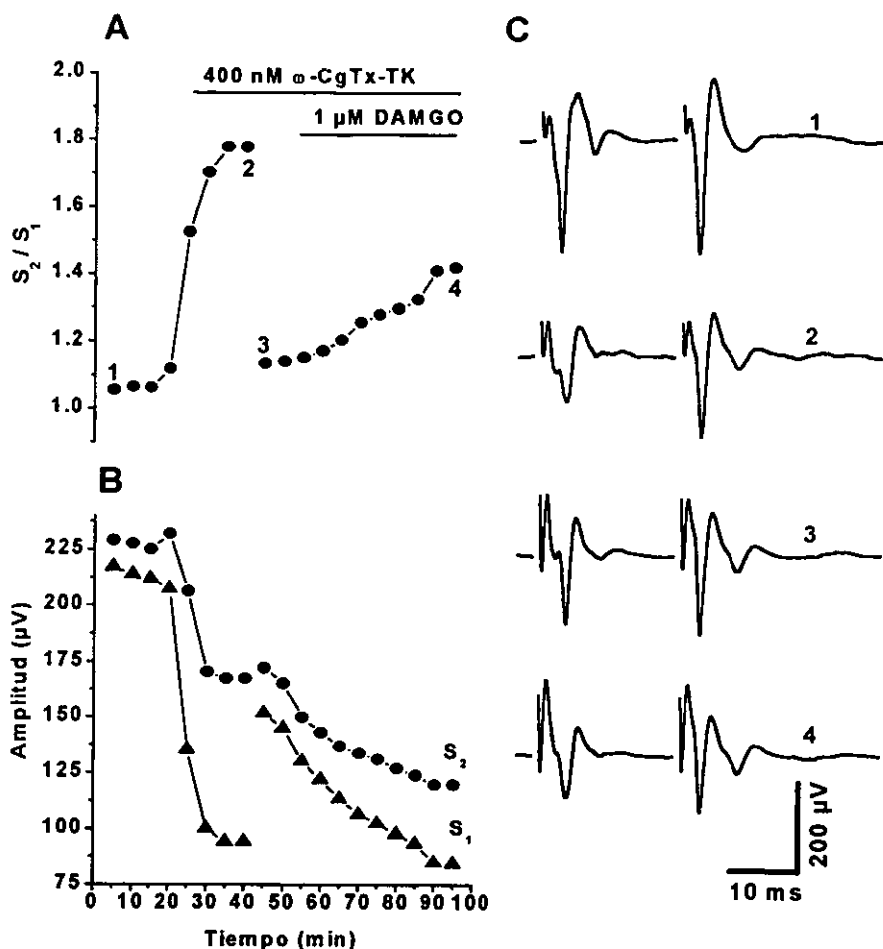


Figura 17. Efecto de DAMGO en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM). (A) La aplicación de 1 μ M de DAMGO en presencia de ω -AgTx-TK (400 nM) sigue produciendo un incremento de la FPP (S_2/S_1) ($n=4$, $p < 0.05$; U de Mann-Whitney). El bloqueo de los canales de calcio tipo Q no ocluyó el efecto de la activación de receptores tipo μ a opiáceos. (B) Cambio en la amplitud de las repuestas ortodrómicas respecto al curso temporal. (C) Registros representativos del experimento.

	Control	DAMGO 1 μ M.	ω -CgTx-GVIA 1 μ M + DAMGO	ω -AgTx-TK 30 nM+DAMGO	ω -AgTx-TK 400 nM DAMGO
Media	1.050	1.565	1.675	2.067	1.631
Mediana	1.041	1.401	1.536	2.067	1.438
E.S.	0.014	0.087	0.195	0.011	0.238
D.S.	0.049	0.313	0.337	0.016	0.413
Significancia		$p < 0.001$ n=10, t Student	$p < 0.05$ n=4, U de M-W	$P < 0.05$ N=4, U de M-W	$p < 0.05$ n=4, U de M-W

Tabla 4. Resumen de los experimentos anteriores. Efecto de DAMGO sólo y en presencia de los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} . Observe el efecto de DAMGO en presencia de 400 nM de ω -AgTx-TK. Las toxinas no ocluyen el efecto de DAMGO por lo que estos resultados sugieren que la inhibición presináptica dada por activación de los receptores tipo μ es a través de las conductancias de calcio. No hubo diferencia significativa entre los grupos (ANOVA & Kruskal-Wallis).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

La transmisión corticoestriatal comanda y hecha a andar el circuito de los ganglios basales (Calabresi, et al., 1993). Las terminales corticoestriatales hacen sinapsis sobre las dendritas de las NEMs, que cuando son activadas se producen respuestas postsinápticas excitatorias (Cherubini, et al., 1988; Graybiel, 1990).

Se ha reportado que la aplicación de CNQX (5-10 μM), antagonista del receptor de glutamato tipo AMPA, y APV (30-50 μM) antagonista del receptor tipo NMDA, bloquean la respuesta ortodrómica poblacional, lo que indica la naturaleza glutamatérgica de las entradas corticoestriatales (Calabresi, et al., 1993). La liberación de glutamato de las terminales corticoestriatales está modulada presinápticamente a través de diferentes tipos de receptor (Malenka y Kocsis, 1988; Bargas, et al., 1998b; Calabresi, et al., 1993), los cuales generalmente reducen la liberación de glutamato (inhibición presináptica) (Calabresi, et al., 1993). La modulación presináptica de las terminales corticoestriatales es importante para regular la transferencia de información desde la corteza hacia el neocórtex (Malenka y Kocsis, 1988).

Protocolo de Facilitación por Pulso Pareado.

El NE no presenta una estructura laminar por lo que la estimulación ortodrómica y el registro de campo no pueden aislar la respuesta sináptica poblacional del potencial de acción poblacional. Siempre la actividad sináptica está mezclada con potenciales de acción ortodrómicos (Barral et al., 1999). Sin embargo, el paradigma de la FPP puede separar los eventos pre del post sinápticos (Dunwiddie y Hass, 1985; Andreassen y Hablitz, 1994). Y los argumentos que lo sustentan son los siguientes:

1. La disminución del Ca^{2+} externo, la aplicación de bloqueadores de los canales de Ca^{2+} así como la aplicación de diversos agonistas a los receptores presinápticos reducen la amplitud de la 1a y 2a respuestas ortodrómicas simultáneamente, pero no en la misma proporción, pues la reducción de la 1a respuesta es mayor

incrementándose de esta manera la FPP (S_2/S_1). Los efectos postsinápticos deberían producir cambios en la amplitud de ambos componentes, y mantener la misma proporción entre ambas respuestas.

2. Los cambios en la FPP obtenidos con registro poblacional son similares a los observados con registros intracelulares de potenciales sinápticos y registros de fijación de voltaje (Hernández-Echeagaray, et al., 1998). Por lo que se considera que el protocolo de FPP es una herramienta útil para evaluar la inhibición presináptica. El incremento en la proporción S_2/S_1 (facilitación sináptica), se debe al aumento de calcio en la terminal debido al calcio residual en la primera respuesta (Katz y Miledi, 1967; 1968; 1970). Lo que trae como consecuencia un incremento en la liberación de transmisor, durante la segunda respuesta. (Figura 1).

3. La liberación de transmisor depende de los cambios en la concentración interna del Ca^{2+} en la terminal (Llinás, et al., 1992). Experimentos anteriores muestran que en estas sinapsis glutamatérgicas, la liberación de neurotransmisor depende de la entrada de calcio a través de canales de calcio de los tipos N, P/Q y R (Bargas, et al., 1998b).

Inhibición presináptica por la activación de los receptores a opiáceos μ y δ .

Como ya se ha mencionado, el NE es el núcleo con más altas concentraciones de receptores a opiáceos (Graybiel, 1991). La distribución de receptores es heterogénea (Bowen, et al., 1981), ya que los receptores μ se encuentran en los parches (Hamel y Beaudet, 1987; Wang y Pickel, 1998) mientras que los receptores δ están más ampliamente distribuidos en los parches y la matriz (Tempel y Zukin, 1987; Wang et al., 1996).

Estudios previos han señalado que la activación de receptores a opiáceos μ , δ y κ , producen inhibición presináptica o disminución de la liberación de glutamato en las sinapsis corticoestriatales (Jiang y North, 1992). Se ha sugerido que un decremento

en las conductancias de Ca^{2+} o un incremento en las conductancias de K^+ podrían explicar la inhibición presináptica (Childers, 1993; North, 1986, 1993). En esta tesis se decidió determinar si la inhibición presináptica producida por opiáceos se debe a una modulación de las conductancias de Ca^{2+} de la terminal.

DPDPE produce inhibición presináptica que es bloqueada por naltrindole.

La aplicación DPDPE incrementa la facilitación sináptica por pulso pareado ($FPP=S_2/S_1$) indicando que la activación de receptores δ a opiáceos produce inhibición presináptica. Este efecto se ve bloqueado en presencia del antagonista selectivo naltrindole (1nM). Esto sugiere que la activación se debe sólo a receptores opioides del tipo δ . El porcentaje de FPP producido DPDPE fue de $73 \pm 15\%$ mientras que Jiang y North (1992) reportaron una inhibición del 30%. Los resultados de Rawls (1999) mostraron que el naltrindole revierte la liberación de glutamato en sinaptosomas del NE sugiriendo que los receptores δ actúan en estas terminales (Rawls, et al., 1999). También, se ha mostrado que la activación de receptores de tipo δ inhibe la liberación de acetil colina (Mulder, et al., 1991), y de dopamina (Schlösser, et al., 1995) en el NE.

Efecto de DPDPE en presencia de los bloqueadores del canal de calcio.

Se ha mostrado que los canales de calcio de los tipos N y P/Q actúan cooperativamente para la liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales (Bargas, et al., 1998b). Estos canales pueden ser modulados por diferentes tipos de receptor (Wu y Saggau, 1997; Dunwiddie y Hass 1985).

Los canales de calcio de tipo N son importantes en la liberación de neurotransmisor ya que la aplicación de ω -CgTx-GVIA reduce la corriente de calcio presináptica (Cox y Duplan, 1992; Boland, et al., 1994). En el neocórtico, la aplicación de ω -CgTx-GVIA reduce en un 63% la espiga poblacional (Bargas, et al

1998b) e incrementa la FPP (Barral, et al., 1999). La participación de los canales de tipo N en la liberación de neurotransmisor está, por tanto, demostrado. Investigaciones en líneas celulares NG 108-15 (Taussig, et al., 1992) y líneas celulares de carcinoma (Sher, et al., 1996) han mostrado la regulación de los canales de calcio tipo N por la activación de receptores δ . Sin embargo, nuestros resultados (figura 11) muestran que en presencia de ω -CgTx-GVIA se sigue observando el efecto de DPDPE. Por lo que se concluye que ω -CgTx-GVIA no ocluye el efecto de DPDPE. Por lo tanto, los receptores de tipo δ no modulan la salida de transmisor a través de regular la entrada de Ca^{2+} por el canal de tipo N.

La ω -AgTx-TK (30 nM) incrementa la FPP. Este bloqueador de los canales tipo P reduce en un 54% la espiga poblacional (Bargas, et al., 1998b). En presencia de esta concentración de ω -AgTx-TK el DPDPE sigue teniendo efecto. Por lo que concluimos que este canal no es la vía para el control de la inhibición presináptica mediante los receptores tipo δ .

Cuando se bloquean los canales de tipo Q, que se sabe son importantes en la liberación de glutamato en todo el SNC (Takahashi y Momiyama, 1993; Teramoto, et al., 1995), con ω -AgTx-TK (400 nM) el efecto de DPDPE no se ve bloqueado. Se nota una tendencia a disminuir pero no es significativa. Esto sugiere que el efecto del DPDPE sobre la liberación de neurotransmisor no está mediado por canales de calcio tipo Q.

Los resultados anteriores sugieren que la inhibición presináptica provocada por los receptores de tipo δ es a través de la modulación de la entrada de Ca^{2+} en las terminales glutamatérgicas. Por lo que se piensa que esta inhibición puede estar dada por la activación de otras conductancias iónicas probablemente de K^+ (North, et al., 1987; Tatsumi, et al., 1990). Se ha sugerido que la activación de conductancias de K^+ puede estar dada a través de proteínas G (Fan y Crain, 1995). El efecto de los receptores δ sobre las conductancias de K^+ es de gran importancia ya que estas

corrientes, pueden hiperpolarizar la membrana disminuyendo la duración del potencial de acción y por tanto, disminuir la cantidad de neurotransmisor liberado (North, 1986; 1993).

La inhibición presináptica producida por DAMGO es bloqueada por el antagonista selectivo CTOP.

La aplicación de DAMGO (1 μ M) incrementa la FPP. Este efecto se ve bloqueado por el antagonista específico CTOP (1 nM) lo que demuestra que el efecto es específico para el receptor de tipo μ presente en las terminales. El porcentaje de FPP aumentado por DAMGO fue de $56 \pm 8\%$. De la misma manera, estudios previos han mostrado que la activación de receptores μ inhibe la liberación de glutamato en un 60% provocado por altas concentraciones de K^+ en rebanadas de cerebro corticales (Nicol, et al., 1996) y en sinaptosomas (Sbrenna, et al., 1999). Jiang y North (1992) mostraron una inhibición del potencial sináptico excitatorio de un 30% de las terminales corticoestriatales.

Efecto de DAMGO en presencia de bloqueadores de calcio.

DAMGO en presencia de ω -CgTx-GVIA.

Se ha mostrado que la activación de receptores μ modula los canales de tipo N y P/Q en diversas regiones del SNC, como en el núcleo del tracto solitario donde la aplicación de ω -CgTx-GVIA bloquea el efecto de DAMGO. Por lo que sabe que la activación del receptor μ puede modular el canal de calcio de tipo N. De la misma manera, la aplicación de ω -AgTx-TK puede bloquear el efecto de DAMGO, por lo que se piensa que los receptores μ también modulan a los canales de tipo P/Q (Rhim y Miller, 1994).

En neuronas magnocelulares del cerebro anterior basal (Soldo y Moises, 1997) así como en neuronas del jiro periacueductal (Chang-Ju, et al., 1997) la activación del receptor μ modula la entrada de calcio a través del canal de tipo N.

Sin embargo, los resultados de la presente investigación muestran que en estas terminales glutamatérgicas, ω -CgTx-GVIA no bloquea la inhibición presináptica producida por DAMGO, lo que sugiere que el receptor μ no actúa a través de regular la entrada de calcio por el canal tipo N.

DAMGO en presencia de ω -AgTx-TK.

La aplicación de ω -AgTx-TK a la concentración de 30 nM tampoco bloquea el efecto de DAMGO. Por lo que los datos sugiere que el receptor μ no actúa a través del canal de calcio de tipo P. En contraste, se ha mostrado la modulación del canal tipo P en el núcleo del tracto solitario (Rhim y Miller, 1994) por la activación del receptor μ . Al incrementar la concentración de ω -AgTx-TK a 400 nM, se observó que no se ocluye significativamente el efecto de DAMGO, lo que sugiere que el canal de tipo Q tampoco es la vía mediante la cual se modula la liberación de transmisor en estas terminales.

RECEPTORES μ Y δ .

Los resultados anteriores demuestran que ambos receptores opioides μ y δ modulan la liberación de transmisor de las terminales glutamatérgicas que llegan al NE. Se determinó que la activación de estos receptores están modulando la liberación de glutamato ejerciendo una inhibición presináptica en las terminales corticoestriatales. Esta inhibición puede servir para prevenir el exceso de liberación de neurotransmisor, ajustar la fuerza sináptica o ambos (Wu y Saggau, 1997). Varias observaciones sugieren un papel de los opioides en la regulación de la transferencia

de información en el circuito neuronal neocortical (Jiang y North, 1992; Schlösser, et al., 1995).

Resultados previos utilizando agonistas para diferentes neuromoduladores tales como: muscarina (Sugita et al., 1991); baclofen (Seabrook, et al., 1990; Barral, et al., 2000), adenosina (Malenka y Kocsis 1988) y carbacol (Malenka y Kocsis 1988) han mostrado un incremento de la FPP de las terminales corticoestriales en un porcentaje mayor al reportado para los opiáceos. Lo que sugiere que estas terminales están sujetas a ser moduladas por varios neurotransmisores. Resultados previos en el laboratorio han mostrado que la modulación colinérgica incrementa la FPP en un 245 % (Barral, et al., 1999) y que el baclofen lo hace en un 457 % (Barral, et al., 2000). En contraste, la FPP del agonista δ fue de $73 \pm 15\%$ y la del receptor μ de un $56 \pm 8\%$, lo que confirma resultados previos en estas terminales corticoestriales (Jiang y North, 1992), además de trabajos en otras sinapsis como el globo pálido externo (Stanford y Cooper, 1999), núcleo acumbens (Martin, et al., 1997) y el núcleo del tracto solitario (Rhim y Miller, 1994). Sin embargo, es posible que los receptores a opiáceos expresados en las terminales presinápticas estén acoplados debilmente a la inhibición de liberación de glutamato (North y Williams, 1983).

Por otro lado, se mostró que la inhibición de la liberación de transmisor en las terminales glutamatérgicas por la activación de los receptores δ y μ no involucra a los canales de Ca^{2+} encargados de disparar esta liberación. Los resultados sugieren que los opiáceos tal vez esten actuando a través de conductancias de K^+ , como se ha sugerido en diferentes investigaciones (North et al., 1987; Fan y Crain, 1995; Ponce, et al., 1996).

CONCLUSIONES.

La liberación de neurotransmisor en las terminales corticoestriatales depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo N y P/Q.

La activación de los receptores μ y δ inhibe la liberación de neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales, demostrándose un efecto presináptico.

La activación de los receptores a opioides tipo δ y μ no producen inhibición presináptica a través de la modulación de los canales de calcio tipo N y P/Q.

Por lo que estos resultados sugieren que la modulación de la liberación de glutamato en las terminales glutamatérgicas puede estar dada por la activación de conductancias de K^+ u otros mecanismos.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, E.M., Augustine, G.J., Duffy, S.N., y Charlton, M.P. (1991). Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J. Neurosci.* 11: 1496-1507.
- Andersen, P., Bliss, T.V.P., y Skrede, K.K. (1971). Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp. Brain Res.* 13: 208-221.
- Anderson, K.D., y Reiner, A. (1990). Extensive co-occurrence of substance P and dynorphin in striatal projection neurons: an evolutionarily conserved feature of basal ganglia organization. *J. Comp. Neurol.* 295: 339-369.
- Andreassen M, Hablitz JJ. (1994). Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: a patch-clamp study in rat hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* Jul 72:1 326-36.
- Arbib, M. P. Erdi J. y Szentágothai. (1998). Basal Ganglia en: Neural Organization, structure function and dynamics. MIT.Press. Cambridge. Cap.10. pp. 303-328.
- Bargas, J., Ayala, G.X., Hernández, E. y Galarraga, E. (1998b). Ca²⁺-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Research. bull.* 45: 521-524.
- Bargas, J., Galarraga, E., y Aceves, J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recording. *Brain Res.* 539: 159-163.
- Bargas, J., Galarraga, E., y Aceves, J. (1998a). Los ganglios basales. Cap.10. Fisiología. Células, órganos y sistemas. Comps: Muñoz-Martínez E.J. y García J. FCE. Méx. Vol.5. pp.257-273.
- Bargas, J. y Galarraga, E. (1995). Firing responses modulation in neostriatal projection neurons by cholinergic and dopaminergic agonists. En : *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function.* Ed. by Ariano, M.A. y Surmeier, D.J. 183-191.
- Barral, J., Galarraga, E. y Bargas, J. (1999). Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channel. *Brain Res. Bull.* 49: 285-289
- Barral, J., Toro, S., Galarraga, E., y Bargas, J. (2000). GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Neurosci. Lett.* 283: 33-36.
- Barrett, E.E. y Stevens, C.F. (1972). The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 227: 691-708.
- Bean, A.J. y Scheller, R.H. (1997). Better late than never: a role for Rab3 late in exocytosis. *Neuron.* 19: 751-754.
- Bolam, J.P., Wainer, B.H., y Smith, A.D. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience.* 12: 711-718.
- Boland, L.M. Morill, J.A., y Bean, B.P. (1994). ω -conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 14: 5011-5027.

- Bourinet, E., Soong, T. W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J., y Snutch, T.P. (1999). Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nal. Neurosci.* 5: 407-415.
- Bowen, W.D., Gentleman, S., Herkenham, B., y Pert, C.B. (1981). Interconverting mu and delta forms of the opiate receptor in rat striatal patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 4818-4822.
- Brodal, P. (1992). *The Central Nervous System. Structure and Function.* Oxford University Press. Inc. Printed in the United States of America. Cap.10. pp. 246-261.
- Brody, D.L. y Yue, D.T. (2000). Relief of G-protein inhibition of calcium channels and short-term synaptic facilitation in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Neurosci.* 20: 889-898.
- Calabresi, B.P., Mercuri, N.B., y Bernardi, G. (1993). Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Progress in Brain Research.* 99: 299-308.
- Calcagneti, Helmstetter, F.J., y Fanselow, M.S. (1988). Analgesia produced by centrally administered DAGO, DPDPE and U50488H in the formalin test. *European Journal of Pharmacology.* 153: 117-122.
- Canepari, M. y Cherubini, E. (1998). Dynamics of excitatory transmitter release: Analysis of synaptic responses in CA3 hippocampal neurons after repetitive stimulation of afferent fibers. *J. Neurophysiol.* 79: 1977-1988.
- Catterall, W.A. (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *24: 307-323.*
- Catterall, W.A. (1999). Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann. N.Y. Sci.* 868: 144-159.
- Charlton, M.P., Smith, S.J., y Zucker, R.S. (1982). Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse. *J. Physiol.* 323; 173-193.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A., y Yu, L. (1993a). Molecular cloning and functional expression of a mu opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44: 8-12.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., y Yu, L. (1993b). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem. J.* 295: 625-628.
- Cherubini E, Henting PL, Lanfumey L, y Stanzione P. (1988). Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones in vitro. *J Physiol (Lond)* Jun 400: 677-90
- Childers, S.R. (1991). Opioid receptors-coupled second messengers systems. *Life Sci.* 48:1991-2003.
- Childers, S.R. (1993). Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Handb. Exp. Pharmacol.* 104:189-216.
- Cordingley, G.E., y 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.
- Cox, D.H., y Dunlap, K. (1992). Pharmacological discrimination of N-type from L-type calcium current and its selective modulation by transmitters. *J. Neurosci.* 12: 906-914.
- Cuello, A.C. (1978). Endogenous opioid peptides in neurons of the human brain. *Lancet.* 2: 291-3.

- Cuello, A.C., y Paxinos, G. (1978). Evidence for a long leu-enkephalin striopallidal pathway in rat brain. *Nature*. 271: 178-180.
- Debanne, D., Guéroux, N.C., Gähwiler, B.H., y Thomson, S.M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J. of Physiol.* 491: 163-176.
- De Bello, W.M., O'Connor, V., Dresbach, T., Whiteheart, S.W., y Wang, S.S.H. (1995). SNAP-mediated protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. *Nature*. 373: 626-630.
- Del Castillo, J., y Katz, B. (1954). Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *Journal of Physiology*. 124: 574-585.
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, E.S. Gurnett, A.C., y Campbell, P.K. (1997). Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*. 385: 446-450.
- Dhawan, B.M., Cesselin, F., Raghurir, R., Reisine, T., Bradley, P.B., Portoghese, P.S., y Hamon, M. (1996). International Union of Pharmacology. XII. Classification of Opioid Receptor. *Pharmacological Reviews*. 48: 567-58.
- DiFiglia, M., Pasik, P., y Pasik, T. (1976). A golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res*. 114: 245-256.
- Dodge, F.A., y Rahamimoff, R. (1967). Cooperative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 193: 419-432.
- Dunwiddie, T.V. y 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.
- Evans, C.J., Keith, D.E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K., y Edwards, R.H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*. 258: 1952-1955.
- Fan SF, y Crain SM. (1995). Dual regulation by mu, delta and kappa opioid receptor agonists of K⁺ conductance of DRG neurons and neuroblastoma X DRG neuron hybrid F11 cells. *Brain Res* Oct 23 696:1-2 97-105.
- Fang, L., Knapp, R.J., Horvath, R., Matsunaga, T.O., Haaseth, R.C., Hruby, V.J., Porreca, F., y Yamamura, H.I. (1994). Characterization of [³H]naltrindole binding to delta opioid receptors in mouse brain and mouse vas deferens: evidence for delta opioid receptor heterogeneity. *The J. of Pharmacol. And Exp. Ther.* 268: 836-846.
- Flores-Hernández, J., Galarraga, E., y Bargas, J. (1997). Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse*. 25: 185-195.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer R.E., Li, C., y Rosahl, T.W. (1994). Synaptotagmin 1: a major Ca release sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*. 79: 717-727.
- Gerfen, C., 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of well compartmental organization in the basal ganglia, *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 285-320.
- Goldstein, A. y James, I.F. (1984). Multiple opioid receptors. Criteria for identification and classification. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 503-505.

- Graybiel, A.M., y Ragsdale, C.W. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5723-5726.
- Graybiel, A.M., y Ragsdale, C.W. (1983). Biochemical anatomy of the striatum. In: *Chemical neuroanatomy* (Emson, P.C. ed), pp 427-504. New York: Raven.
- Graybiel, A.M., Ragsdale, C.W., Yoneoka, E.S., y Elde, R.P. (1981). An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 6: 377-397.
- Graybiel, A.M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13: 244-254.
- Graybiel A.M. (1991). Basal ganglia--input, neural activity, and relation to the cortex. *Curr Opin Neurobiol* Dec 1:4 644-51
- Grillner S, Deliagina T, Ekeberg Ö, el Manira A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN, y Wallén P. (1995) Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* Jun 18:6 270-9.
- Hamel, E. y Beaudet, A. (1987). Ultrastructural distribution of mu opioid receptors in rat neostriatum. *Neurotransmitter Interactions in the Basal Ganglia.* pp 59-69.
- Hamm HE, y Gilchrist A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* Apr 8:2 189-96.
- Herlitze, S., Garcia, D.E. Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., y Catterall, W.A. (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein subunits. *Nature.* 280: 258-262.
- Hernández-Echeagaray, E., Galarraga, E., y Bargas, J. (1998). 3- α -chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology.* 37: 1493-1502.
- Hill, M.P., y Brodchie, J.M. (1996). Modulation of glutamate release by a k-opioid receptor agonist in rodent and primate striatum, *Eur. J. Pharmacol.* 281: R1-R2.
- Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes.* Sunderland M.A.: Sinauer. pp. 83-115.
- Hubbard. J.I., Jones, S.F., y Landau, E.M. (1968). On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. *J. Physiol.* 196: 75-78.
- Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H.W., Forthergill, L.A., Morgan, B.A., y Morris, H.R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature (Lond.)* 258: 577-579.
- Jaffe, J.M. y Martin, W.R. (1990). Opioid analgesics and antagonists, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* (A. Gilman, J. Rall, A. Nies, and Taylor P. eds.), Ed. 8 Pergamon Press, New York. 485-573.
- Jiang, Z.G. y Nort, R.A. (1992). Pre- and Postsynaptic Inhibition by Opioids in Rat Striatum. *The Journal of Neuroscience.* 12 (1): 358-361.

- Johnson, P.S., Wang, J.B., Wang, W.F., y Uhl, G.R. (1994). Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidy turnover. *Neuroreport*. 5: 507-509.
- Johnston, D. y Wu, S.S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. Cambridge, Massachusetts. London. England. pp. 287-357.
- Jones, S.W. (1998). Overview of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30:299.
- Kamiya H, Sawada S, y Yamamoto C. (1988). Synthetic omega-conotoxin blocks synaptic transmission in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett* Aug 15 91:1 84-8.
- Kamiya, H. y Zucker, R.S. (1994). Residual calcio and short-term plasticity. *Nature*. 371: 603-606.
- Katayama, Y., Miyazaki, S., y Tsubokawa, T. (1981). Electrofisiological evidence favoring intracaudate axon collaterals of GABAergic caudate output neurons in the cat. *Brain Res*. 216: 180-186.
- Katz, B. y Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195: 481-492.
- Katz, B. y Miledi, R. (1967). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195: 481-492.
- Katz, B. y Miledi, R. (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol.* 207: 789-801.
- Kawaguchi, Y., Wilson, Ch, J., Augood, S.J. y Emson, P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS*. 18(12): 527-535.
- Kieffer, B., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., y Hirth, C.G. (1992). The delta opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 12048-12052.
- Kieffer, B.L. (1995). Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 615-635.
- Kita, H. Kosaka, T., y Heizmann, C.W. (1990). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res*. 536: 1-15.
- Knapp, R.J., Malatynska, E., Fang, L., Li, X., Babin, E., Nguyen, M., Santoro, G., Vargas, E.V., Hruby, V.J., Roeske, W.R., y Yamamura, H.I. (1994). Identification of a human delta opioid receptor: Cloning and expression. *Life Sci*. 54: PL463-PL469.
- Kosterlitz, H.W., Lord, J.A.H., Paterson, S.J., y Waterfield, A.A. (1980). Effects of change in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu and delta receptors. *Br. J. Pharmacol.* 68: 333-342.
- Lemos, J.R., Ocorr, K.A., y Nordmann, J.J. (1989). Possible role for ionic channels in neurosecretory granules of the rat neurohypophysis. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 44: 333-347.
- Li, C. H., y Chung, D. (1976). Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73: 1145-1148.
- Li, S., Zhu, J., Chen, C., Chen, Y.W., Deriel, J.K., Ashby, B., y Liu-Chen, L.Y. (1993). Molecular cloning and expression of a rat κ opioid receptor. *Biochem. J.* 295: 629-633.
- Llinás, R., y Moreno, H. (1998). Local Ca^{2+} signaling in neurons. *Cell Calcium*. 24: 356-366.

- Llinás R.R, Sugimori M, y Cherksey B. (1989). Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci* 560: 103-11.
- Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, y Cherksey B. (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca^{2+} channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* Sep 15:9 351-5.
- Lord, J. A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J., y Kosterlitz, H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. 267: 495-499.
- Lovinger, M.D., Merritt, A., y Reyes, D. (1994). Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neuroscience*. 62: 31-40.
- Lovinger, M.D. y Tyler, E. (1996). Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *International review of neurobiology*. 39: 77-111.
- Magleby, K.L. (1987). Short-term changes in synaptic efficacy. En: *Function synaptic*. (Ed: Edelman, G.M. Gall, W.E., Cowan, M).
- Malenka, R.C., y Kocsis, J.D. (1988). Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neurosci*. 8: 3750-3756.
- Manabe, T., Wylie, D.J.A., Perkel, D.J., y Nicoll, R.A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects of paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol*. 70: 1334-1340.
- Mannalack, D.T., Beart, P.M., y Gundlach, A.L. (1986). Psychotomimetic \square -opioids and PCP. *Trends Pharmacol. Sci* 7: 448-451.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., y Watson, S.J. (1987). Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci*. 7: 2445-2464.
- Martin, W.R. (1984). Pharmacology of opioid. *Pharmacol. Rev* 35: 283-323.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thomson, J.A., Huppler, R.E., y Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine- and naloxone-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 197: 517.
- Matthews, G. (1996). Neurotransmitter release. *Annu. Rev. Neurosci*. 19: 219-233.
- Miller, R.J. (1998). Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 38: 201- 227.
- Min, B.H., Austin, L.B., Felsheim, R.F., Fuchs, J.A., y Loh, H.H. (1994). Genomic structure and analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 9081-9085.
- Misgelg, U., Bijak, M. y Jarolimek, W. (1995). A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol*. 46: 201-206.
- Mulder, A.H., Burger, D.M., Wardah, G., Hogenboom, F., y Frankhuyzen, A. L. (1991). Pharmacological profile of various κ -agonists at κ -, μ - and δ -opioid receptors mediating presynaptic inhibition of neurotransmitter release in the rat brain. *Br. J. Pharmacol*. 102: pp 518-522.

- Mulder, A.H., Wardeh, G., Hogenboom, F., y Frankhuyzen, A.L. (1984). Kappa and delta opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release . *Nature*. 308: 278-280.
- Mulder, A.H., Wardeh, G., Hogenboom, F., y Frankhuyzen, A.L. (1989). Selectivity of various opioid peptides towards δ -, κ - and μ -opioid receptors mediating presynaptic inhibition of neurotransmitter release in the brain. *Neuropeptides*. 14: 99-104.
- Mussacchio, J.M. (1990). The psychomimetic effects of opiates and the sigma receptor. *Neuropsychopharmacology*. 3: 191-195.
- Nicol, B., Rowbotham, D.J., y Lambert, D.G. (1996). μ - and κ -opioid inhibit K^+ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci. Lett*. 218: 79-82.
- North, R.A. (1986). Opioid receptor types and membrane ion channels. *TINS*. 9: 114-117.
- North, R.A. (1993). Opioid actions on membrane ion channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 104:773-797.
- North RA, Williams JT. (1983). Opiate activation of potassium conductance inhibits calcium action potentials in rat locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol Oct 80*:2 225-8.
- North, R.A., Williams, J.T., Surprenant, A., y Christei, M.J. (1987). Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 5487-5491.
- Park, M.R., Lighthall J.W., y Kitai, S.T. (1980). Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res*.194: 359-369.
- Pasternak, G. W. (1988). *The Opiate Receptors*. The Humana Press, Clifton, NJ.
- Ponce, A., Bueno, E., Kentros, C., Vegas-Saenz de Minera E., Chow, A., Hillman, D., Chen, S., Zhu, L., Wu, M.B., Wu, X., Rudy, B., y Thornhill, W.B. (1996). G-protein-gated inward rectifier K^+ channel proteins (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain. *J. Neurosci*. 16: 1990-2001.
- Precht, W. y Yoshida, M. (1971). Blockage of caudate-evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin. *Brain Res*. 32: 229-233.
- Quock, R.M., Burkey, T.H., Varga, E., Hosohata, Y., Hosohata, K., Cowell, S.M., Slate, Ch.A., Ehler, F.J., Roeske, W.R., y Yamamura, H.I. (1999). The δ -opioid receptor: Molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacological Reviews*. 51: 503-532.
- Rall, W. (1992). Path to biophysical insights about dendrites and synaptic function. En: *The Neurosciences: paths of Discovery II*. Ed. Samson F., y Adelman, G. Boston: Birkhauser.
- Randall, A.D., y Tsien, R.W. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacol*. 36: 879-893.
- Raws, S.M., McGinty, J.F., y Terian, D.M. (1999). Presynaptic κ -opioid and muscarinic receptor inhibit the calcium-dependent component of evoked glutamate release from striatal synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*. 73: 1058-1065.
- Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G. I., y Reisine, T. (1994). Pharmacological Characterization of the Cloned κ -, δ -, and μ -Opioid Receptors. *Molecular Pharmacology*. 45:330-334.
- Reisine, T. y Bell, G.I. (1993). Molecular biology of opioid receptors. *Trends. Neurosci*. 16: 506-510.

Rhim H, Miller RJ. (1994). Opioid receptors modulate diverse types of calcium channels in the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Neurosci*. Dec 14:12 7608-15.

Sadikot, A.F., Parent, A., y Francois, C. (1990). The centre median and parafascicular thalamic nucleus project respectively to the sensorimotor and associative-limbic striatal territories in the monkey. *Brain Res*. 510: 161-165.

Satoh, M. y Minami, M. (1995). Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol. Ther.* 68: 343-364.

Sbrenna S, Marti M, Morari M, Calo G, Guernini R, Beani L, y Bianchi C. (1999). L-glutamate and gamma-aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by kappa- and mu- but not delta- and opioid receptor like-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* Dec 291:3 1365-71.

Schlösser, B., Kudematsch, M.B., Sutor, B., y Bruggencate, G. (1994). Inhibitory actions of opioids on synaptic transmission in the rat neostriatum, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 20, Part 2. 708.15.

Schlösser, B., Kudematsch, M.B., Sutor, B., y Bruggencate, G. (1995). δ , μ and κ opioid receptor agonists inhibit dopamine overflow in rat neostriatal slices. *Neuroscience Letters*. 191: 126-130.

Seabrook GR, Howson W, Lacey M.G. (1990). Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABAB receptors on neurones in rat brain slices. *Br J Pharmacol* Dec 101:4 949-57.

Shepherd, G.M. y Phil, M.D.D. (1994). *Neurobiology 3^a ed.* N.Y. Oxford University Press. pp. 760.

Sher E, Cesare P, Codignola A, Clementi F, Tarroni P, Pollo A, Magnelli V, y Carbone E. (1996) Activation of delta-opioid receptors inhibits neuronal-like calcium channels and distal steps of Ca(2+)-dependent secretion in human small-cell lung carcinoma cells. *J Neurosci* Jun 1 16:11 3672-84

Smith, S.M., Piedras-Rentera, E.S., Namkung, Y., Shin, H.S., y Tsien, R.W. (1999). Neuronal voltage-activated calcium channels: on the roles of the alpha 1E and beta 3 subunits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 868: 175-198.

Simmon, M.L. y Chavkin, C.(1996). Endogenous opioid regulation of hippocampal function, *Int. Rev. Neurobiol.* 39: 145-196.

Simon, E.J. y Hiller, J.M. (1994). Opioid peptides and opioid receptors. **En Basic Neurochemistry.** (Ed) Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. y Molinoff, P.B. Raven Press. New York. pp. 321-339.

Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Matthes, H., Nappey, V., y Lannes, B. (1994). The human δ -opioid receptor: Genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Molecular Pharmacology*. 46: 1015-1021.

Snutch, T.P. y Reiner, P.B. (1992). Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 247-253.

Sofuoglu, M., Portoghese, P.S., y Takemori, A.E. (1991). Differential Antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* 257: 676-680.

Soldo BL, Moises HC. (1997) mu-Opioid receptor activation decreases N-type Ca²⁺ current in magnocellular neurons of the rat basal forebrain. *Brain Res* May 30 758:1-2 118-26.

- Standifer, K.M. y Pasternak, G.W. (1997). G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal*. 9: 237-248.
- Stanford, I.M. y Cooper, A.J. (1999). Presynaptic μ and δ opioids receptor modulation of GABA_A IPSCs in the rat globus pallidus *in vitro*.
- Strosberg, A.D. (1991). Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur. J. biochem*. 196: 1-10.
- Sudhof, T.C. (1997). Function of Rab3 GTP-GDP exchange. *Neuron*. 18: 519-522.
- Sugita S, Uchimura N, Jiang ZG, y North RA. (1991). Distinct muscarinic receptors inhibit release of gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* Mar 15 88:6 2608-11.
- Takahashi, T. y Momiyama, A. (1993). Different types of calcium channels mediated central synaptic transmission. *Nature*. 366: 156-158.
- Tanabe T, Mikami A, Niidome T, Numa S, Adams BA, y Beam KG. (1993). Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle. *Ann N Y Acad Sci* Dec 20 707: 81-6.
- Tanabe, Y., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi-Takahashi, H., y Kangawa, K. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. 328:313-318.
- Tatsumi H, Costa M, Schimerlik M, y North RA. (1990) Potassium conductance increased by noradrenaline, opioids, somatostatin, and G-proteins: whole-cell recording from guinea pig submucous neurons. *J Neurosci* May 10:5 1675-82.
- Taussig R, Sanchez S, Rifo M, Gilman AG, y Belardetti F. (1992) Inhibition of the omega-conotoxin-sensitive calcium current by distinct G proteins. *Neuron* Apr 8:4 799-809.
- Tempel A, Zukin RS. (1987). Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 84:12 4308-12.
- Teramoto, T., Niidome, T., Kimura, M., Ohgoh, M., Nishizawa, Y., Katayama, K., Mayumi, T., y Sawada, K. (1997). A novel type of calcium channel sensitive to ω -agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Research*. 756: 225-230.
- Teramoto, T., Niidome, T., Miyagawa, T., Nishizawa, Y., Katayama, K., y Sawada, K. (1995). Two types of calcium channels sensitive to ω -agatoxin-TK, in cultured rat hippocampal neurons. *NeuroReport*. 6: 1684-1688.
- Toro, B.S. (1999). Tesis: Modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas al neocórtex de la rata por activación de los receptores GABA_B. Facultad de Ciencias. UNAM. p. 1-81.
- Tsien, R.W., Ellior, P.T., y Home, W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci*. 12: 349-354.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. y Fox, A.P. (1988). Types of Neuronal Calcium Channels and Their Selective Modulators. *Trends. Neurosci*. 11: 431-438.

Udenfriend, S. y Meienhofer, J. (1984). The peptides. Vol.6, Opioid Peptides: Biology. Chemistry and Genetics (Academic Press, New York).

Walker D, y De Waard M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. Trends Neurosci Apr 21:4 148-54.

Wang, J. B., Imia, Y., Eppler, C.M., Gregor, P., Spivak, C.E., y Uhl, G.R. (1993). Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 10230-10234.

Wang, J. B., Jhonson, P.S., Persico, A.M., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., y Uhl, G.R. (1994a). Human mu opiate receptor: cDNA and genomic clones, Pharmacologic characterization and chromosomal assignment. FEBS Lett. 338: 217-222.

Wang, J. B., Jhonson, P.S., Wu, J.M., Wang, W.F., y Uhl, G.R. (1994b). Human kappa opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human mu/kappa chimeras. J. Biol. Chem. 269: 25969-25969.

Wang, H., Moriwaki, A., Wang, J. B., Uhl, G. R., y Pickel V.M. (1996). Ultrastructural Immunocytochemical Localization of μ Opioid Receptors and Leu5-Enkephalin in the Patch Compartment of the Rat Caudate-Putamen Nucleus. The Journal of Comparative Neurology. 375:659-674.

Wang H, y Pickel VM. (1998). Dendritic spines containing mu-opioid receptors in rat striatal patches receive asymmetric synapses from prefrontal corticostriatal afferents. J Comp Neurol Jun 29 396:2 223-37.

Westenbroek, R.E., Hoskins, L., y Catterall, W.A. (1998). Localization of Ca²⁺ channels subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. J. Neurosci. 18: 6319-6330.

Wheeler, D.B., Randall, H., y Tsien, R.W. (1994). Roles of N- type and Q- type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science. 264: 107-113.

Wilson, Ch. J. (1998). Basal Ganglia. En: Shepherd, G.M. (ed). The Synaptic organization of the Brain. 4ed. Oxford University Press. USA. pp. 329-376.

Wu, L. y Saggau, P. (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. Trends Neurosci. 20: 204-212.

Yamaguchi, H., Muth, J.N., Varadi, M., Schwartz, A., y Varadi, G. (1999). Critical role of conserved proline residues in the transmembrane segment 4 voltage sensor function and in the gating of L-type calcium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 1357-1362.

Yamamoto, C. (1973). Neurotransmitter actions studied in brain slices. Adv. Neurol. Sci. 17: 64-70.

Yamamura, M.S., Horvath, R., Toth, G., Otvos, F., Malatynska, E., Knapp, R.J., Porreca, F., Hruby, V.J., y Yamamura, H.I. (1992). Characterization of [³H] naltrindole binding to delta opioid receptors in rat brain. Life Sci. 50: PL 119-PL 124.

Yang, H.Y., Hong, J.-S., y Costa, E. (1977). Regional distribution of leu and met-enkephalin in rat brain. Neuropharmacology. 16: 303-307.

Yasuda, K.K., Raynor, H., Kong, C.D., Breder, J. Takeda, T. Reisine y G.I. Bell. (1993). Cloning and functional comparison of k and d opioid receptors from mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6736-6740.

Yokoyama, C.T., Sheng, Z-H., y Catterall, W.A. (1997). Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J. Neurosci.* 17: 6929-6938.

Yoshida, M., y Precht, W. (1971). Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers. *Brain Res.* 32: 225-228.

Zamponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J. y Snutch, T.P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit [see comments]. *Nature.* 385: 6615. 442-446...

Zucker, R.S. (1989). Short-term plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* 12: 13-31.

Zucker, R.S. (1996). Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron.* 17: 1049-1055.