

0038/
48



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACION DE CORRIENTES DE POTASIO Y CALCIO POR
SOMATOSTATINA EN CELULAS DEL NEOESTRIADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
MAESTRA EN CIENCIAS
MARIA DEL CARMEN VILCHIS QUINTERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE BARGAS DIAZ

MEXICO, D.F.

OCTUBRE 2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Bargas D por su apoyo en la realización de este proyecto, pero sobre todo por su confianza y su influencia académica duradera y significativa. A la Dra Elvira Galarraga porque siempre contamos con su apoyo en la realización de nuestros proyectos.

Y a los investigadores miembros del Jurado

Dra María Luisa Fanjul Peña
Dra. Hortensia Gertrudis González Gómez
Dr. José Bargas Díaz
Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez
Dra. María Elvira Galarraga Palacio
Dr. Froylan Gómez Lagunas
Dra Marcia Hiriart Urdanivia

Quienes con sus comentarios y sugerencias mejoraron este trabajo

A la memoria de mi Mamá

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padres y hermanos, cuñados y sobrinos por su apoyo, porque me enseñaron valores y sobre todo me dieron un hogar lleno de cariño.

A mis amigos de siempre:

Alejandro, Elizabeth Chacón, Mónica Salas, Jorge, Celia, Rocío, Mónica Romo, Elizabeth Hernández, Salvador, Xochitl, Jorge Flores, Gustavo y Víctor.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por su apoyo, amistad y compañía.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Síntesis de la Somatostatina	2
Receptores a la Somatostatina	4
Acoplamiento a Proteínas G y Sist. de Transducción	6
Ganglios Basales	9
Neoestriado	10
Canales de potasio dependientes de calcio	14
BK	14
SK	16
IK	17
Canales de Calcio	17
Estructura molecular	18
Clasificación	20
PLANTEAMIENTO	22
OBJETIVOS	22
MÉTODO	23
RESULTADOS	25
Artículo de modulación de canales de calcio por somatostatina	
Modulación de canales de potasio por somatostatina	26
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

La somatostatina (SOM) es un péptido que se distribuye por todo el sistema nervioso central y periférico, inhibe la secreción de hormonas y funciona como un neuromodulador con efectos sobre la actividad locomotora y las funciones cognoscitivas. Las acciones de la SOM son mediadas a través de la activación de 5 tipos de receptores acoplados a proteínas G (SSTR1-5). Este péptido modula corrientes de potasio y de calcio en neuronas, en células endocrinas y en líneas celulares tales como la línea celular de pituitaria AtT-20 y en células PC12.

En el neoestriado la SOM es sintetizada y liberada por interneuronas medianas no espinosas. Se ha reportado que la SOM, modula la liberación de GABA y dopamina en este núcleo. Estos efectos pueden ser el resultado de la modulación por SOM de diferentes conductancias, por lo que en el presente trabajo se investigaron las acciones de la SOM sobre corrientes de potasio y de calcio en células del neoestriado.

Se llevaron a cabo registros de fijación de voltaje en neuronas espinosas medianas en la configuración de célula entera. Las corrientes salientes fueron provocadas por comandos de voltaje despolarizantes desde -60 a 30 mV en pasos de 10 mV a un potencial de mantenimiento de -80 mV, en presencia de 3 mM de 4-AP para eliminar las corrientes transitorias. Las corrientes de K activadas por calcio tipo BK en estas células representan el 30%, mientras que las de baja conductancia tipo SK presentan un 25%, el resto se debe al rectificador retardado. La aplicación de SOM a una concentración de 1 μ M incrementó la corriente saliente en un 39%. Por otro lado, en presencia de TEA 1 mM (bloqueador de canales BK), la SOM redujo la corriente un 24%. Estos resultados muestran una modulación diferencial de la corriente saliente por la SOM. En presencia de apamina (bloqueador de canales SK), la SOM produjo un incremento del 59% en la corriente.

Debido a que uno de los efectos de la SOM más ampliamente reportados es la modulación de las corrientes de calcio y dado que la reducción en la concentración intracelular de calcio, puede afectar varios procesos celulares dentro de los cuales está la activación de los canales de K^+ , se estudió la modulación de los canales de calcio por SOM.

La SOM redujo las corrientes de calcio en un 35%, así como los potenciales de calcio en un 24%. Esta acción es producida en presencia de TTX y es bloqueada por un antagonista de la SOM (cyclo-SOM). Con el objetivo de conocer cual o cuales canales de calcio son modulados por el neuropéptido, se usaron los diferentes bloqueadores de estos canales. Los resultados muestran que la SOM modula preferencialmente los canales de calcio tipo P/Q y en menor grado los tipo N y R, sin tener efecto sobre los canales tipo L.

Tanto las corrientes de calcio como las de K dependientes de calcio participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante y debido a que la SOM modula ambas en estas células investigamos los efectos de ésta sobre el patrón de disparo de las células. La SOM redujo la amplitud del postpotencial hiperpolarizante un 39%, lo cual provocó en algunas células un aumento en el disparo de las células mientras que en otras se produjo un disparo irregular.

Con estos resultados concluimos que la SOM ejerce acciones complejas sobre las neuronas de proyección a través de la activación de sus receptores, por lo que se espera que la SOM y sus análogos tengan profundos efectos sobre las funciones motoras controladas por los ganglios basales.

INTRODUCCIÓN

La somatostatina (SOM), es un péptido que se distribuye en el sistema nervioso central y periférico, en el tracto gastrointestinal, en el páncreas endocrino y en células de la tiroides (Patel, 1992, 1999). En el sistema nervioso central, se expresa en estructuras tales como el hipotálamo, corteza, hipocampo, tálamo, tallo cerebral, estriado y médula espinal (Brazeau, 1972; Reichlin, 1983; Epelbaum, 1986).

Este péptido participa en la regulación de la liberación de un gran número de hormonas y neurotransmisores, inhibe la secreción de la hormona de crecimiento, de la hormona estimulante de la tiroides y de prolactina de la pituitaria; así como de la insulina y el glucagón del páncreas (Brazeau, 1972; Reichlin, 1983; Epelbaum, 1986).

La SOM funciona como un neuromodulador en el cerebro con efectos sobre funciones autónomas, sensoriales, locomotoras y cognitivas (Reichlin, 1983; Epelbaum, 1994; Patel, 1992) Modula la liberación de dopamina en el cerebro y en particular en el estriado (Chesselet, 1983), así como de GABA en el mismo estriado (Meyer, 1989), de serotonina en la corteza, hipocampo e hipotálamo (Tanaka, 1981), de norepinefrina (Gothert, 1980), de la hormona liberadora de la tirotropina y de la misma somatostina en el hipotálamo

Existen 2 formas biológicamente activas, la SOM-14 y la SOM-28, que pueden o no, actuar en forma similar (Wang et al 1989, Dryer et al 1991, Schweizer et al 1993).

SÍNTESIS

La SOM es sintetizada a partir de una molécula precursora -la preprosomatostatina- (Goodman et al , 1980, 1983). En mamíferos sólo un gene que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3, codifica para esta pre-prohormona de 116 aminoácidos, la cual es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, y es directamente liberada al lumen del retículo donde la región amino terminal del péptido líder es eliminada por la acción de una proteasa específica (Walter et al., 1984). Entonces, la prohormona de 92 aminoácidos es transportada al aparato de Golgi, donde es empaquetada en vesículas secretorias. En estas vesículas sufre modificaciones post-traduccionales para generar 2 formas bioactivas: la SOM-14 y la SOM-28. El rompimiento de la prohormona requiere la actividad de 6 enzimas endoproteolíticas Furin, PC1/PC3, PC2, PACE-4, PC4 y PC5/PC6 (Seidah, et al., 1990; Seidah, 1993) El rompimiento toma lugar en residuos monobásicos y dibásicos (Brakch, et al., 1993). En general, parece que la prosomatostatina es procesada diferencialmente dependiendo del tipo celular que la expresa (Brakch et al 1995).

En neuronas y en células del páncreas, el principal producto es la SOM-14, que se genera por la acción de la enzima PC-2 y en menor grado por la PC-1 (Brakch et al 1995, Patel, 1999) Además, se ha mostrado que la SOM-14 se puede sintetizar a partir de la SOM-28, por medio de la actividad de la enzima PACE-4.

La SOM-14 se cree que es degradada por la acción de al menos 2 endoproteasas, la 24.15 una enzima soluble de 68 KD y la 24.16 una enzima asociada a membrana de 70 KD (Dahms y Mentlein, 1992).

Por otro lado, la SOM-28 es más que un precursor de la SOM-14, representa del 20-30% de la inmunoreactividad a SOM en el cerebro (Patel, 1999) Se ha demostrado, que en algunas regiones cerebrales tiene efectos fisiológicos similares a la SOM-14, mientras que en otras provoca respuestas distintas, además en algunos casos puede ser más potente que la SOM-14 (Mandarino et al 1981) (fig 1).

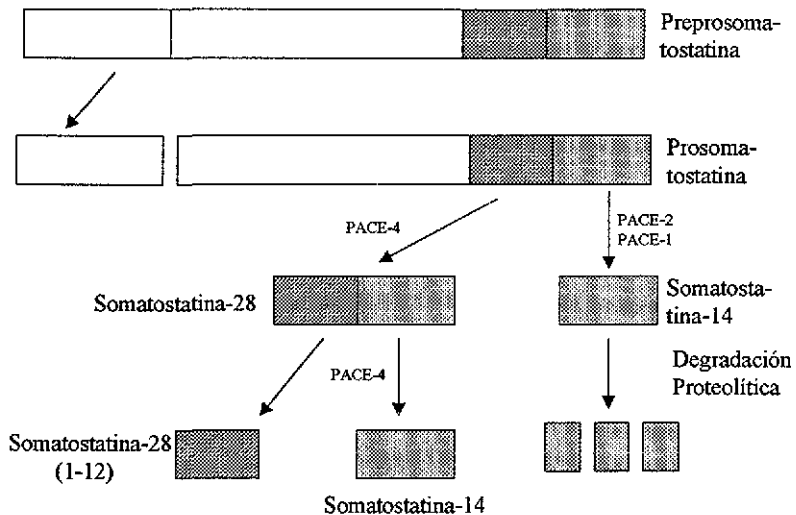


Fig 1 Vía de síntesis de la somatostatina, procesamiento proteolítico desde preprosomatostatina (Tomado de Schindler et al. 1996).

RECEPTORES

Los efectos intracelulares causados por la SOM son mediados por una familia de cinco receptores relacionados, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Bell y Reisine, 1993; Hoyer, 1994), son denominados sstr1-5. Se agrupan en 2 clases dependiendo de su estructura y sus características farmacológicas. La clase SRIF-1 comprende los subtipos SSTR2, SSTR3 y SSTR5; mientras la clase SRIF-2 comprende los subtipos SSTR1 y SSTR4 (Hoyer, 1994; 1995) (fig 2). La diferencia principal entre estas 2 clases de receptores es su alta afinidad para ciertos análogos cortos de la SOM, tales como el octreotido y el octastin, así como el efecto de diferentes iones sobre la unión de los ligandos, se ha demostrado que altas concentraciones de magnesio y bajas de sodio afectan la unión del radioligando hacia los distintos tipos de receptores (Hoyer, 1994), (tabla 1).

Receptores a Somatostatina

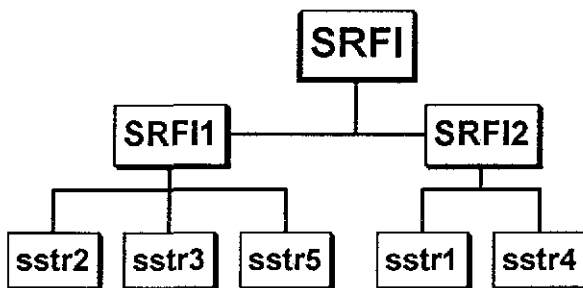


Fig 2 Clasificación de los receptores de somatostatina.

Se han identificado 5 genes para los receptores a SOM, los cuales están segregados en cromosomas diferentes. Los genes de los receptores 1, 3, 4, y 5 carecen de intrones clásicos. El gene del receptor 2 muestra un intron críptico en el segmento 3', el cual da 2 variantes por procesamiento alternativo, una forma larga SSTR-2A y una corta SSTR2B (Patel et al., 1993;

Vanetti et al., 1992). Estas variantes sólo difieren en la longitud de su dominio citoplasmático. Existe un 39-57% de identidad en sus secuencias, siendo el séptimo segmento transmembranal altamente conservado. Los 5 receptores muestran de 1 a 4 sitios de glucosilación en su segmento amino terminal y en su segunda asa extracelular. Todos los receptores se caracterizan por tener de 3 a 8 sitios de fosforilación por la proteína cinasa A (PKA), la cinasa C (PKC), y la calmodulina cinasa II, en el carboxilo terminal y en la segunda y tercera asa intracelular. Los receptores hSSTR 1, 2, 4 y 5, muestran una región de 12 aminoácidos cisteína en el séptimo segmento transmembranal, el cual puede ser un sitio potencial de anclaje a la membrana. La unión covalente de ácido palmítico en esta posición igualmente crea una cuarta asa citoplásmica. Resulta interesante que aunque el hSSTR3m carece del anclaje a la membrana por palmitoilación en cisteína, presenta un carboxilo terminal más largo que los otros miembros de la familia.

Los 5 subtipos de receptores muestran un alto grado de conservación estructural a través de las especies del 94-99% de identidad entre los receptores del humano, de la rata y del ratón (Patel, 1995; Reisine, 1995).

Los 5 subtipos unen SOM-14 y SOM-28 con alta afinidad. SSTR1-4 unen SOM-14 con mayor afinidad (>) que la SOM-28; mientras que el SSTR-5 es 10 veces más selectivo para SOM-28. Se ha propuesto, que la SOM se une a sus receptores a través de la interacción tanto con residuos hidrofóbicos como cargados localizados en los segmentos transmembranales III y VII, con una contribución potencial del asa extracelular 2 (Kaupmann, et al., 1995; Greenwood et al., 1997). Debido a su gran longitud y flexibilidad, los ligandos naturales SOM-14 y SOM-28, pueden presumiblemente adoptar una conformación que permite su interacción con el sitio de unión de sus 5 receptores.

En la rata, se ha localizado el RNAm para SSTR1-5 en la corteza cerebral, estriado, hipocampo, amígdala, bulbo olfatorio y área preóptica (Bruno et al., 1994; Harrington, 1995; Pérez y Hoyer, 1995). Sin embargo, de manera interesante el mensajero del receptor tipo 3 está preferencialmente distribuido en el cerebelo (Kong et al., 1994); mientras que el del tipo 4 es el menos expresado en el cerebro (Thoss et al., 1996).

Por otro lado, utilizando técnicas de inmunocitoquímica se ha reportado la presencia de los receptores SSTR-1 en las capas 2, 3, 5, y 6 de la corteza cerebral, en el área CA2 y en el giro dentado del hipocampo, en el hipotálamo, en el cerebro medio y en la capa granular de la corteza cerebelar (Hervieu, 1998). La distribución del SSTR2 en el cerebro de la rata muestra una rica expresión en las capas 2, 3, 5 y 6 de la corteza cerebral, en los ganglios basales y en las áreas 5

CA1-2 del hipocampo (Dournaud et al , 1996). Estudios de doble marcaje han sugerido que este subgrupo se presenta preferentemente como autorreceptores sobre neuronas inmunopositivas a SOM. El SSTR-3 se localiza predominantemente en las capas V y VI de la corteza cerebral y en la capa granular del cerebelo (Kumar et al , 1996). Los receptores 4 y 5 se distribuyen en el núcleo arcuato ventromedial y en la eminencia media (Kumar et al., 1999)

COMPUESTO	ESTRUCTURA PRIMARIA	RECEPTOR
SOM-28	lis-arg-glu-arg-pro-ala-met-ala-pro-asn-ala-ser-NH ₂ ala-gli-cis-lis-asn-fe-fe-trp cis-ser-thr-fe-thr-lis	SSTR5 > SSTR1-4
SOM-14	NH ₂ -ala-gli-cis-lis-asn-fe-fe-trp cis-ser-thr-fe-thr-lis	SSTR1-4 > SSTR5
RC-160 (vapreotido)	Dfe-cis-tir-Dtrp trp-cis-val-lis	SSTR5>>SSTR2, 3, 4
SMS-201-995 (octreotido)	Dfe-c(cis-fe-D-trp-lis-thr-cis)-thr-o1	SSTR2>>SSTR1, 3, 5
BIM23014 (lanreotido)	Dbnal-cis-tir-Dtrp thr-cis-val-lis	SSTR2=SSTR5>> SSTR1, 3, 4
MK 678 (siglítico)	c(N-me-ala-tir-D-trp-lis-val-fe)	SSTR2>>SSTR1-5

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de la SOM-28, SOM-14 y algunos péptidos relacionados que funcionan como agonistas (Tomado de Patel Y 1999).

ACOPLAMIENTO A PROTEÍNAS G Y SISTEMAS DE TRANSDUCCION.

Los receptores a SOM provocan sus respuestas celulares a través de la modulación, unida a proteínas G, de múltiples sistemas de segundos mensajeros, incluyendo adenilato ciclasa, canales iónicos de calcio y potasio, el antiportador de Na⁺/K⁺, la guanilato ciclasa, la fosfolipasa C, la fosfolipasa A2, la MAP cinasa, la serina/treonina y la fosfotirosil proteína fosfatasa (Patel et al., 1995, 1997; Reisine, 1995). Los receptores de SOM, son potentes inhibidores de la adenilato ciclasa y la formación de AMPc, a través de la activación de todas las subunidades G α i

Se sabe que la interacción de la proteína G con el receptor (tipos 2, 3, 4, 5), se lleva a cabo con la tercer asa citoplásmica. Aún, no se conoce el dominio de unión de esta proteína con el receptor del subtipo 1. El SSTR2A purificado de GH₄C₁ y expresado en células CHO, es capaz de asociarse con G α i1, G α i2 y G α i3 (Luthin et al. 1993, Gu et al. 1997). El SSTR3 interactúa con G α i1, G α i2, G α i4 y G α i6. Las proteínas G específicas que se asocian con los otros subtipos aún no se determinan (fig. 3).

Los receptores nativos de SOM, están acoplados a varios subtipos de canales de potasio, incluyendo rectificadores retardados (Wang et al. 1989), rectificadores entrantes GIRK (Sodickson y Bean 1998), canales de potasio sensibles a ATP (De Weille et al. 1989) y canales de potasio sensibles a calcio de alta conductancia (BK) (White et al. 1991).

La activación de los canales de potasio por el receptor a SOM, induce hiperpolarización de la membrana, conduciendo a una reducción en la entrada de calcio (fig. 3). Adicionalmente a este efecto indirecto, la SOM actúa directamente sobre canales de calcio. (Wang et al. 1990, Meriney et al. 1994, Ishibashi y Akaike 1995, Tallent et al. 1996, Viana y Hille 1996, Boehm y Betz 1997)

El efecto de la SOM sobre los canales de calcio y de potasio puede ocurrir adicionalmente a través de la defosforilación de las proteínas del canal después de la activación de una serina/treonina fosfatasa (White et al. 1991). Además, la SOM puede inhibir corrientes de calcio a través de la inducción de GMPc, el cual activa una proteína cinasa G (PKG), con la inhibición dependiente de fosforilación (Meriney et al. 1994). La SOM activa un número de fosfatasas tales como la serina/treonina fosfatasa y la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (Buscail et al. 1994, 1995, Florio et al. 1994, 1996; Reardon et al. 1997), fig 3.

Otra vía de señalización que se ha descrito para los receptores a SOM, incluye la formación de IP₃ mediado por la fosfolipasa C en astrocitos, en células CHO y en músculo liso (Marin et al. 1991, Murthy et al. 1996)

La vía de la fosfolipasa A₂ es otra fuente de mediadores implicados en la transducción de señales de la SOM, esta enzima cataliza la liberación de ácido araquidónico, produciendo varios eicosanoides a través de la activación de 2 vías metabólicas principales, la vía de la ciclooxigenasa para formar prostaglandinas y tromboxanos y la vía de la lipooxigenasa para formar leucotrienos (fig 3). Algunos productos de la lipooxigenasa modulan canales de potasio en células de Purkinje de cerebelo de rata. El ácido araquidónico *per se* y ciertos ácidos grasos pueden directamente modular canales de potasio (Piomelli, 1990; Meves 1994; Duerson 1996). 7

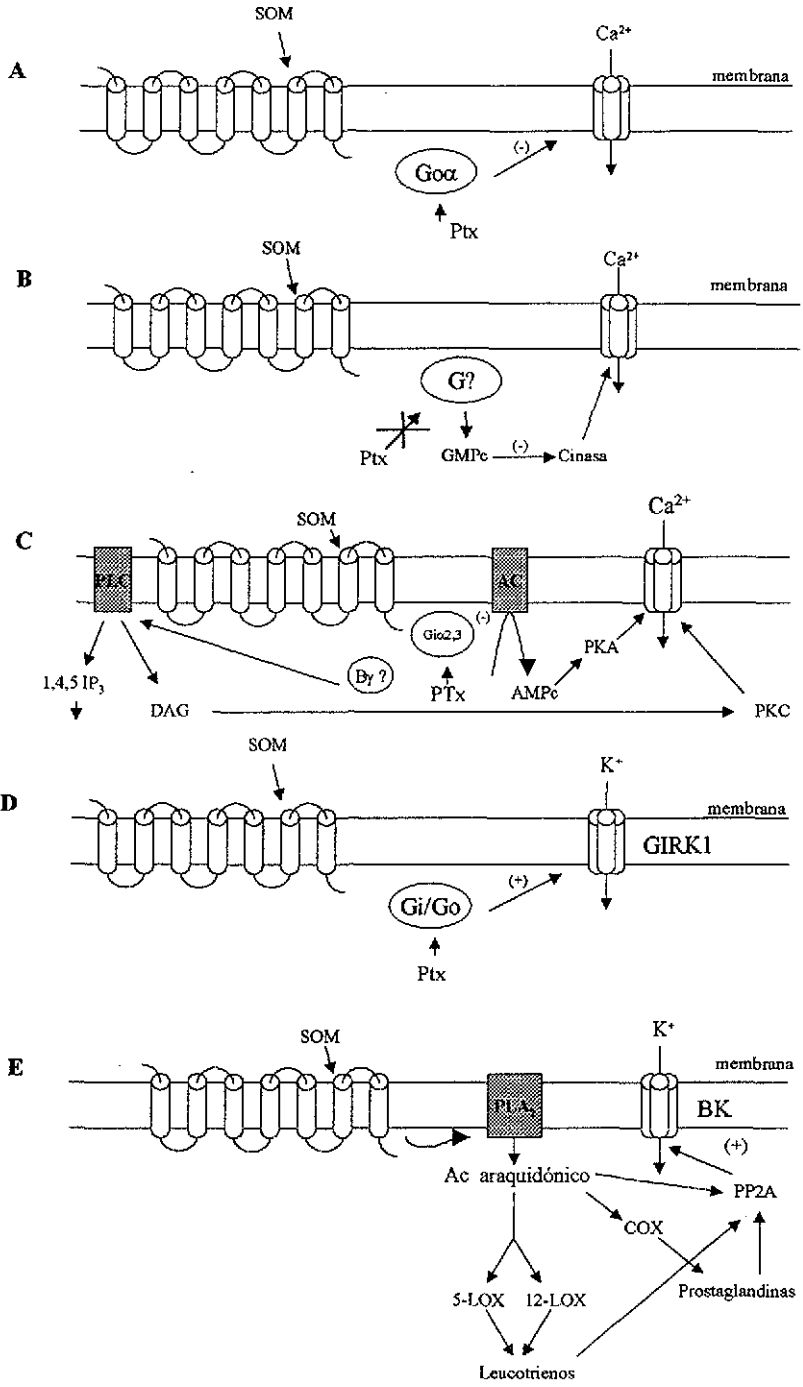


Fig 3. Algunas de las posibles vías de señalización intracelular activadas por la SOM.

LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB), comprenden un grupo de núcleos subcorticales que están involucrados en una variedad de procesos incluyendo funciones motoras y cognitivas. Una de sus principales funciones es la de integrar información sensoriomotora, asociativa y límbica. Los GB se piensa que controlan los movimientos por un delicado balance de su transmisión, a través de dos circuitos que conectan los núcleos de entrada y de salida (las vías directa e indirecta), las cuales son afectadas en procesos patofisiológicos tales como la enfermedad del Parkinson o la corea de Huntington (Wilson, 1998).

Los GB están constituidos por el neostriado, el globo pálido (interno y externo), la sustancia negra (pars compacta y reticulata) y el núcleo subtalámico (Fig. 4). La principal entrada a los GB se deriva de las células de la corteza cerebral, que proyectan de manera topográfica al neostriado, donde la información es procesada y es pasada a los núcleos de salida de los GB, el segmento interno del globo pálido y la sustancia negra pars reticulata. Los GB a través de las proyecciones de sus núcleos de salida, influyen así la actividad del tálamo, de la corteza y de regiones premotoras corticales.

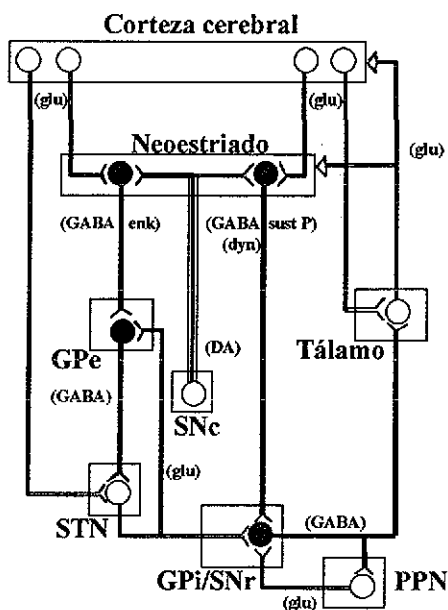


Fig 4 Conexiones de los Ganglios Basales. Vías directa e indirecta y neurotransmisores involucrados: glutamato, GABA, encefalinas, dinorfinas, sustancia P y dopamina. (Tomado de Arbib et al. 1998).

NEOESTRIADO

El neocestriado está formado por los núcleos caudado, putamen y acumbens. Recibe entradas sinápticas glutamatérgicas de las áreas motoras, sensoriales y de asociación de la corteza cerebral, de los núcleos intralaminares del tálamo y del núcleo basolateral de la amígdala, así como dopaminérgicas de las neuronas de la sustancia negra *pars compacta* y serotoninérgicas de las neuronas del núcleo raquí dorsal (Wilson, 1990).

En el neocestriado el 95% de la población neuronal está formado por las células de proyección o espinosas medianas (Di Fligia, 1976). Estas células presentan un soma cuyo diámetro es de 12-20 μm , del cual surgen de 4-5 dendritas primarias que presentan un gran número de espinas. Su axón surge del soma o del tronco de una dendrita proximal y emite varias colaterales las cuales se arborizan profusamente antes de dejar la vecindad del soma. Dicha arborización permite a las células de proyección participar en interacciones de circuitos locales dentro del estriado (Park et al. 1980). Estas células sintetizan y liberan el ácido γ -amino butírico (GABA) como neurotransmisor (Ribak et al. 1979; Fisher et al. 1986), además coexpresan un número de péptidos neuroactivos tales como la sustancia P, encefalinas, dinorfinas y neurotensinas. No todos estos péptidos se encuentran en cada célula, sino que son contenidos en subgrupos particulares de neuronas espinosas medianas. En una neurona individual el GABA coexiste con sustancia P o encefalinas y/o dinorfinas. La coexistencia del GABA con un péptido dado está en correlación con su sitio blanco, así las neuronas que contienen sustancia P proyectan al globo pálido interno y sustancia negra *pars reticulata* formando la vía directa, la cual entonces proyecta al tálamo. Por otro lado, las neuronas que presentan encefalinas proyectan al globo pálido externo formando la vía indirecta, entonces este núcleo proyecta al núcleo subtalámico (fig. 4).

Además de las neuronas espinosas medianas existen cuando menos tres clases de interneuronas, las cuales se diferencian con base en sus características morfológicas y fisiológicas (Kawaguchi, 1992, 1995) (fig. 5).

Las interneuronas de la primera clase (células de disparo rápido), disparan potenciales de acción con un postpotencial hiperpolarizante de corta duración. A potenciales despolarizados muestran un disparo repetitivo inducido por activación sináptica. Estas células son inmunoreactivas a parvalbúmina (Cowan et al. 1990; Kita et al. 1990). Estas células además son subdivididas en dos tipos morfológicos, las que presentan campos dendríticos locales y las que

tienen campos dendríticos extendidos. Los axones de ambos tipos tienen colateralización densa dentro y cerca de sus campos dendríticos (fig. 5).

Las células de la segunda clase se caracterizan por ser inmunoreactivas a la NADPH diaforasa (Vincent et al 1983) y a la óxido nítrico sintetasa, enzima involucrada en la síntesis del óxido nítrico (Dawson et al. 1991). Además, se conoce que estas células sintetizan somatostatina y neuropéptido "Y". Estas neuronas presentan un diámetro de 12-25 μm y representan del 1-2% de la población total. Se ha demostrado que reciben entradas sinápticas corticales directas (Kawaguchi et al., 1995) Estas células disparan espigas despolarizantes dependientes de sodio persistente y de corrientes de calcio de bajo umbral "T" a potenciales hiperpolarizados (fig. 5)

La tercera clase incluye células de gran tamaño (30 μm), con postpotenciales hiperpolarizantes de larga duración y fuerte rectificación hiperpolarizante (Wilson et al 1990; Jiang y North 1991, Kawaguchi 1992). Estas células son colinérgicas dado que presentan inmunoreactividad a la enzima acetilcolina transferasa (Bolam et al 1984; Phelps et al. 1985) (fig. 5)

En el neocórtex, excepto las colinérgicas todos los demás tipos de interneuronas son GABAérgicas y presentan alta inmunoreactividad a la glutamato descarboxilasa (GAD), enzima involucrada en la síntesis de este neurotransmisor.

Se ha reportado que el neocórtex tiene una estructura modular, presenta islas químicamente diferentes llamadas "parches o estriosomas", embebidos en la matriz (Graybiel, 1990; Gerfen, 1989, 1992) Estas dos estructuras tienen diferentes sistemas de entrada y salida. Se cree que las células de diferentes regiones de la corteza proyectan a la matriz y a los parches, mientras que algunas a uno u otro compartimiento. Muchas de las proyecciones corticales al estriado que llevan información sensorial y locomotora, terminan en la matriz, la cual proyecta al globo pálido y a la sustancia negra *pars reticulata*. Las proyecciones límbicas terminan en los estriosomas, entonces las células espinosas proyectan a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta*. Además las células de estos módulos no se conectan directamente, de esta manera las interneuronas son los candidatos para establecer las interacciones entre los compartimientos.

Otras interacciones inhibitorias intraestriatales en el neocórtex incluyen las conexiones laterales y recurrentes de las células de proyección. Esta inhibición es solamente activada cuando las células de proyección disparan, produciendo inhibición de las células aledañas (inhibición lateral; Park et al 1980).

La actividad espontánea de las neuronas de proyección registradas "in vivo" se caracteriza por episodios de hiperpolarización mantenidos seguida por episodios de despolarización subumbral del cual pueden surgir potenciales de acción (Wilson, 1990, Wilson y Groves, 1980). En registros de fijación de corriente "in vitro", se ha observado que la aplicación de pulsos despolarizantes de baja intensidad genera una rampa despolarizante con una duración de cientos de milisegundos, en la cual al final se observa el disparo de un potencial de acción (Bargas et al. 1989, Surmeier et al 1992). Cuando se aumenta la amplitud de los pulsos de voltaje se incrementa la frecuencia de disparo (Pineda et al. 1992). Dicha frecuencia es regulada por el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue al potencial de acción, que en estas células se caracteriza por presentar una fase rápida que dura unos cuantos milisegundos, generado por la activación de canales de potasio de alta conductancia (BK). Durante el potencial de acción estos canales se activan y repolarizan rápidamente la membrana, llevándola a potenciales más negativos que el potencial umbral. La fase lenta del postpotencial es generada por los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia (SK) (Pineda et al , 1992) Este tiene una duración de cientos de milisegundos y su curso temporal es el que determina el patrón de disparo, así como la adaptación de la frecuencia de disparo.

El PPH es blanco de múltiples tipos de neuromoduladores que regulan la frecuencia y el patrón de disparo neuronal.

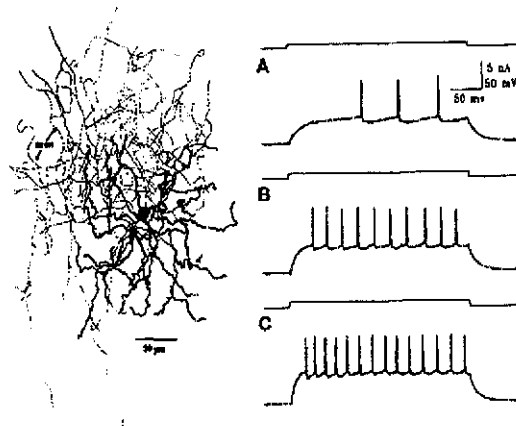


Fig. 5A Morfología y fisiología de la neurona espinosa mediana de proyección del neocórtex. A la izquierda se muestra una reconstrucción del soma y dendritas proximales. A la derecha se muestra el patrón de disparo de la célula en respuesta a diferentes intensidades de estimulación (Tomado de Flores-Hernández et al 1994)

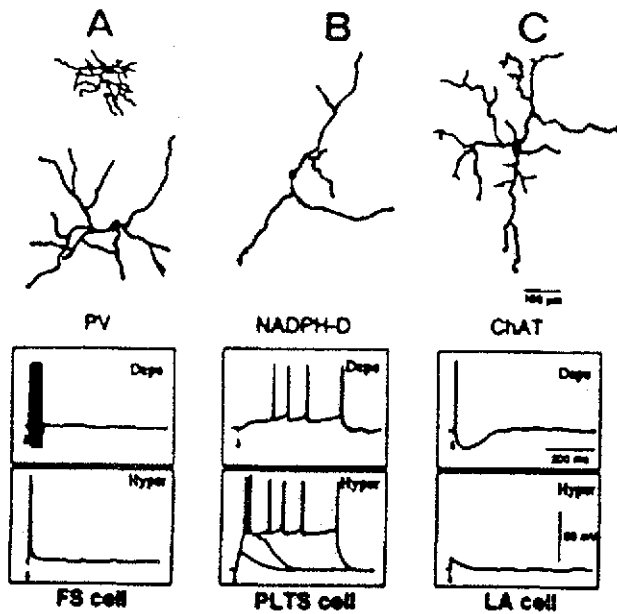


Fig 5B Interneuronas neocorticales A. Interneuronas inmunoreactivas a parvalbúmina, se han subdividido en 2 clases morfológicas con diferentes campos dendríticos, muestran disparo repetitivo inducido por activación sináptica a potenciales despolarizados B. Interneuronas somatostatinérgicas, muestran espigas de bajo umbral dependientes de calcio a potenciales hiperpolarizados. C. Interneuronas colinérgicas presentan diámetros de 30 μm . Estas células muestran un postpotencial hiperpolarizante muy largo después de un potencial de acción. (Tomado de Kawaguchi 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE CALCIO

El cambio en la concentración intracelular de calcio es un mecanismo de señalización que está acoplado a cambios en el potencial de membrana. Estas señales son integradas por una familia de canales de potasio activados por calcio, cuya probabilidad de apertura es incrementada por la elevación del calcio intracelular, produciendo así la hiperpolarización de la membrana. La actividad de estos canales está implicada en muchos procesos fisiológicos incluyendo la neurosecreción, la forma del potencial de acción y la adaptación de la frecuencia de disparo. Estos canales difieren en su estructura primaria y exhiben diferentes conductancias y perfil farmacológico. Cada subtipo juega un papel específico en un proceso fisiológico particular. Se dividen en 3 subfamilias: BK, IK y SK.

CANALES BK

Los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia (BK), contribuyen a la repolarización del potencial de acción (Lancaster y Nicholl 1987, Sah y MacLachlan 1991, Christian 1994) y la fase rápida del PPH. Presentan una conductancia muy alta (hasta 250 pS), se activan por despolarización y por un incremento en la concentración de calcio intracelular (Sah, 1996). Estas propiedades explican su papel modulador de la actividad de los canales de calcio voltaje dependientes con los que coexisten (Robitaille et al., 1993; Wisgrida y Dryer 1994, Sah 1992, 1995, Davies et al. 1996).

Estos canales son complejos de dos clases diferentes de subunidades, la subunidad α formadora del poro y una subunidad reguladora β (García Calvo et al. 1994)

La subunidad α es codificada por un sólo gene con algunas variantes por procesamiento alternativo lo que genera diversidad funcional (Adelman et al. 1992; Tseng-Crank et al., 1994)

Estructura del Canal

La secuencia primaria de los diferentes canales BK de mamíferos es casi idéntica y muestran un alto grado de homología en sus segmentos transmembranales (S1-S6), con los miembros de la superfamilia de los canales de potasio sensibles a voltaje (Jan y Jan, 1997). La homología de los aminoácidos cargados positivamente en el segmento S4 que forman parte del sensor de voltaje es particularmente notable; además, el perfil de hidrofobicidad sugiere la presencia de otros 5 segmentos hidrofóbicos, uno dentro del segmento amino terminal y los otros 4 en el carboxilo terminal (Meera et al., 1997). Se ha mostrado, que el segmento S0 del amino terminal de la subunidad α es transmembranal, y el resto de los residuos del amino terminal están

fuera de la célula (Meera et al., 19997). Los otros 4 segmentos S7-S10, probablemente son citosólicos (fig. 6).

Se ha reportado, que el calcio aplicado internamente cambia la probabilidad de apertura asociada al voltaje y la relación carga voltaje a potenciales más despolarizados (Cox et al., 1997)

Por otro lado, se ha sugerido que una región de 28 aminoácidos, con una gran cantidad de aminoácidos cargados negativamente, principalmente aspartato, entre los segmentos S9 y S10 puede unir calcio y participar en la activación. Esta región es altamente selectiva para calcio, pero se ha propuesto que deben existir otras regiones que unen calcio, que probablemente contribuyan en la activación por calcio (Schreiber y Salkoff, 1997)

La subunidad β se ha propuesto que atraviesa la membrana 2 veces, presentando su amino y carboxilo terminal en el citoplasma. La coexpresión de la subunidad β con la α afecta la sensibilidad al calcio, produciendo un cambio negativo en el intervalo de activación. Además, la subunidad β afecta la unión de caribdotoxina al canal (Hanner, et al. 1997). Aunque muchos canales BK presentan ambas subunidades, parece que las β no forman obligatoriamente parte de todos los canales (Hanner, et al. 1997, McManus et al. 1995, Tanaka et al. 1997).

La secuencia primaria de la subunidad α muestra posibles sitios de fosforilación (Toro et al., 1998). La actividad de estos canales puede ser aumentada o disminuida por proteínas cinasas (Reinhart et al., 1995), (fig. 6)

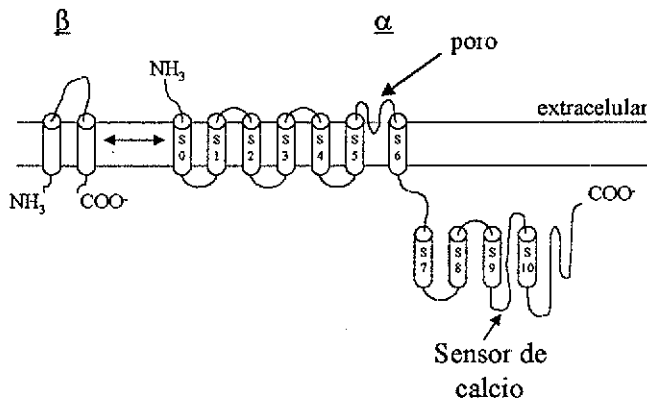


Fig. 6 Modelo estructural del canal de potasio dependiente de calcio de alta conductancia (BK) La subunidad α formadora del poro y la β reguladora. El sensor de calcio se ha propuesto que se encuentra entre el segmento S9 y S10. (Modificado de Cox et al. 1997).

CANALES SK

Los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia (SK) juegan un papel fundamental en todas las células excitables ya que participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante lento (PPH), regulando la adaptación y la frecuencia de disparo neuronal. Estos canales son insensibles al voltaje y son activados por un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio. La activación de estos canales causa la hiperpolarización de la membrana, inhibiendo el disparo de las células. Presentan una estructura molecular similar a la de los canales dependientes de voltaje y a los BK (Köhler et al 1996).

Los canales SK pueden ser clasificados con base en su sensibilidad a la toxina del veneno de la abeja, apamina. Uno de los canales clonados SK2 es altamente sensible a apamina, siendo bloqueados a una concentración media máxima de 60 pM, mientras que los canales SK1 no son afectados por 100 nM de apamina (Köhler et al 1996). Por otro lado, los canales SK3 presentan una sensibilidad intermedia de 1 nM. La sensibilidad a apamina es mediada por 2 residuos, aspartato y asparagina, que se encuentran en lados opuestos en la región formadora del poro (Ishii, 1997).

Los canales sensibles a apamina presentan una conductancia que va de 4-14 pS y se encuentran en prácticamente todo el SNC, mientras que los insensibles a apamina son expresados en muy pocos tipos neuronales y tienen una conductancia de 18 pS (Lancaster et al 1991).

Los canales SK son activados por concentraciones submicromolares de calcio intracelular. Se ha determinado que los canales SK sensibles a apamina requieren de una concentración media máxima de 400 a 800 nM de calcio para su activación, mientras que en los insensibles a apamina va de 600 a 700 nM (Köhler et al 1996). Además, se ha sugerido que se requiere la unión al canal de más de un sólo ion calcio para su activación y que el sensor de calcio es una molécula de calmodulina asociada al canal y que dicha unión puede ser cooperativa al pegar 2 calcio.

Estructura del Canal

Las subunidades del canal SK presentan 6 dominios transmembranales con el amino y carboxilo terminal citoplásmicos, los cuales presentan un gran número de sitios de fosforilación. La mayor homología que presentan con otros canales de potasio está en la región formadora del poro, entre los segmentos transmembranales 5 y 6 (Heginbotham et al., 1994). Interesantemente este canal no presenta sensibilidad al voltaje para su activación (Köhler et al. 1996, Lancaster et al 1991), aunque su 4° segmento transmembranal contiene varios residuos cargados positivamente, como los encontrados en los canales sensibles al voltaje (Jan y Jan, 1989), fig.7. 16

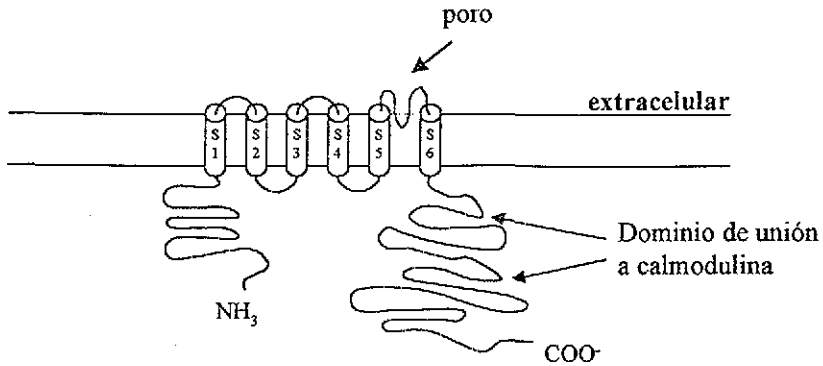


Fig. 7. Estructura molecular de los canales SK. Estos canales presentan una topología similar a la de otras familias de canales de potasio, con seis dominios transmembranales y la región formadora del poro entre los segmentos S5 y S6. No existe un dominio de unión a calcio, pero los canales SK presentan calmodulina unida constitutivamente en la región carboxilo terminal, que funciona como un sensor de calcio.

CANALES IK

Este grupo de canales es muy diverso, con una gran variabilidad en sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas. Son insensibles al voltaje, presentan una conductancia entre 25 y 135 pS y su sensibilidad al calcio es mayor a la mostrada por los canales BK, pero menor a la observada para los canales SK. Se ha estudiado su perfil farmacológico y se ha encontrado que son sensibles a caribdotoxina, clotrimazola y TEA, pero son insensibles a apamina e iberitoxina (Latorre et al., 1989; Ishii et al., 1997; Joiner et al., 1997); sin embargo, como es un grupo altamente heterogéneo no se conocen bloqueadores específicos.

En las neuronas de proyección del neostriado, las corrientes de potasio activadas por calcio son preferencialmente activadas por calcio que entra a las células a través de canales de calcio voltaje dependientes, particularmente los N y Q. El bloqueo de estos canales con toxinas específicas reduce significativamente el PPH en estas células (Vilchis et al., 2000).

CANALES DE CALCIO

Los canales que median el flujo de calcio en respuesta a la despolarización de la membrana son miembros de un superfamilia de genes de canales iónicos. Diversos estudios electrofisiológicos han revelado diferentes corrientes de calcio denominadas tipo L, N, P/Q, R y T.

Las corrientes de calcio tipo L ($\alpha_{1S D C F}$), se caracterizan por su activación a voltajes altos, por su lenta inactivación voltaje y calcio-dependiente, por su marcada regulación por fosforilación e inhibición específica por diferentes drogas antagonistas tales como las dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas (Reuter 1983) Estas corrientes participan en la liberación de hormonas en las células endócrinas, en la regulación de expresión de genes y en la integración de las entradas sinápticas en las neuronas (Bean 1989).

Las corrientes tipo N (α_{1B}), se distinguen por su dependencia al voltaje intermedia, y más rápida inactivación (Nowycky et al 1985). Son bloqueadas por el péptido de un caracol marino, la ω -Conotoxina GVIA (McCleskey et al. 1987, Tsien et al 1988).

Las corrientes tipo P fueron primero registradas en las células de Purkinje (Llinás et al 1989) y se distinguen por su alta sensibilidad a la toxina de araña ω -Agatoxina IVA (Mintz et al. 1992). Las corrientes tipo Q se registraron inicialmente en neuronas granulosas de cerebelo (Randall y Tsien, 1995) y son bloqueadas por la misma toxina que las P pero con menor afinidad. Ambos canales provienen del mismo gene (α_{1A})

Las corrientes tipo R (α_{1E}) son resistentes a los tipos de bloqueadores orgánicos y a las toxinas bloqueadoras de los otros canales de calcio (Randall y Tsien 1995), y existen múltiples subtipos (Tottene et al 1996)

Las corrientes tipo T se activan a potenciales más negativos, se inactivan rápidamente y son sensibles a níquel (Carbone y Lux 1984, Nowycky et al. 1985)

Este perfil farmacológico es el principal método utilizado para distinguir entre los diferentes tipos de corrientes de calcio (tabla 2)

Estructura del canal

Los canales de calcio se han caracterizado bioquímicamente como proteínas complejas compuestas de 4 ó 5 subunidades distintas (α , β , $\alpha_2\delta$ y γ), las cuales son codificadas por múltiples genes (fig 8).

La subunidad α_1 (de la que existen 10 isoformas diferentes) es una proteína de cerca de 2000 aminoácidos, organizada en 4 dominios repetidos (I a IV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos transmembranales, y un asa asociada a membrana entre los segmentos S5 y S6, que incorpora el poro de conducción (Tanabe et al 1993) Los segmentos S4 de cada dominio homólogo sirven como un sensor de voltaje para su activación, moviéndose hacia fuera y rotando bajo la influencia del campo eléctrico, iniciando un cambio conformacional que abre el poro. Los segmentos S5 y S6 y el asa que los une forman el poro y contienen dos glutamatos en cada 18

dominio, que se requieren para la selectividad al calcio. El poro interno es delineado por el segmento S6, el cual forma el sitio receptor para los antagonistas de los canales (Catterall 1995). Adicionalmente esta subunidad contiene sitios de regulación por segundos mensajeros

La subunidad β intracelular, de la cual se han identificado 4 genes diferentes (Pérez-Reyes y Schneider, 1995), modula la cinética de activación e inactivación del canal (Hoffman et al 1994), así la asociación con diferentes subunidades β puede alterar la función de una subunidad α de manera substancial (tabla 2).

La subunidad α_2 es una proteína extrínseca que tiene muchos sitios de glucosilación y varias secuencias hidrofóbicas (Ellis et al ,1988), está unida a través de enlaces disulfuro a la subunidad δ (Gurnett et al 1996). La subunidad δ se sintetiza a partir del mismo gene que α_2 y la forma madura de estas dos subunidades es producida por procesamiento proteolítico post-traduccionnal (De Jongh et al 1990, Jay 1991) Se han identificado los genes que codifican para 4 isoformas del complejo $\alpha_2\delta$ (Klugbauer et al 1999), sin embargo, las diferentes isoformas tienen relativamente poco efecto sobre la dependencia al voltaje y la expresión del canal

Por otro lado se conocen 2 subunidades γ diferentes, estas son glucoproteínas de 4 segmentos transmembranales (Jay et al 1990), que tienen un efecto pequeño, pero significativo sobre la dependencia al voltaje del canal (Letts et al , 1998). Aunque estas subunidades auxiliares modulan las propiedades del canal, la mayor diversidad farmacológica y electrofisiológica de los canales de calcio surge de la existencia de múltiples formas de la subunidad α_1 .

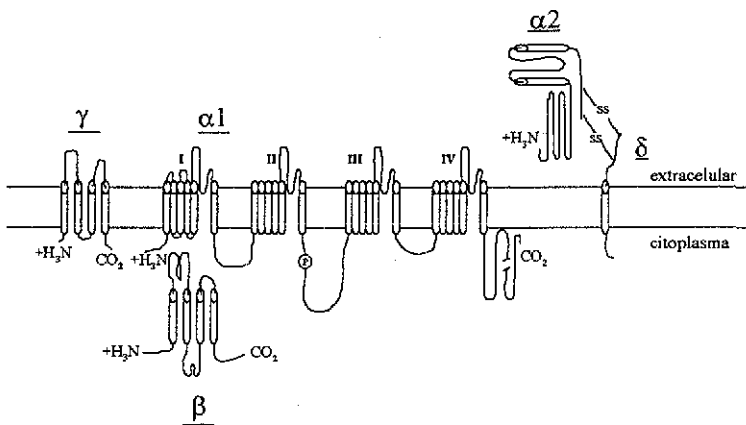


Fig 8A. Estructura del canal de calcio (Ca_v1) purificado de músculo esquelético (Tomado de Catterall, 2000).

cuales puede producir isoformas adicionales por procesamiento alternativo (Pérez-Reyes y Schneider, 1995)

Las diferencias estructurales entre las 3 clases de subunidad α 1, se reflejan en diferencias marcadas en su regulación. La familia de canales Ca_v1 es regulada principalmente por fosforilación a través de cinasas y fosfatasas activadas por segundos mensajeros. En contraste la familia Ca_v2 es regulada por unión directa de proteínas G (Hille 1994, Ikeda y Dunlap 1999, Jones y Elmslie 1997) y proteínas SNARE (Stanley y Mirotnik 1997) Por otro lado, la inhibición de estos canales por proteínas G puede ser revertida por fosforilación mediada por proteína cinasa C (Swartz 1993, Zamponi et al 1997). Se conoce poco de la regulación de la familia Ca_v3 por fosforilación (Catterall 2000)

Canal	Clasificación con base en la subunidad α	Clasificación Numérica	Perfil de inactivación	Farmacología	Subtipo de subunidad β	Efectos sobre la inactivación
P	$\alpha 1A$	$Ca_v2.1$	muy lenta (τ 2 seg)	ω -AgaTx-TK	$\beta 1b$	La acelera
Q	$\alpha 1A$	$Ca_v2.1$	lenta (τ 1 seg)	ω -AgaTx-TK	$\beta 2a$	La entelrece
N	$\alpha 1B$	$Ca_v2.2$	rápida (τ 50-80 ms)	ω -CgTx GVIA	$\beta 3$	La acelera
R	$\alpha 1E$	$Ca_v2.3$	rápida (τ_1 57.5ms, τ_2 211ms)	SNX-482		
L	$\alpha 1C$	$Ca_v1.2$	muy lenta (τ 1.5 seg)	dihidropiridina	$\beta 4$	La entelrece
	$\alpha 1D$	$Ca_v1.3$				
	$\alpha 1F$	$Ca_v1.4$				
	$\alpha 1S$	$Ca_v1.1$				
T	$\alpha 1G$	$Ca_v3.1$	muy rápida (τ 20-50 ms)	no hay bloqueadores específicos		
	$\alpha 1H$	$Ca_v3.2$				
	$\alpha 1I$	$Ca_v3.3$				

Tabla 2 Clasificación de las subunidades α de los canales de calcio y los efectos de la coexpresión con subunidades β . (tomado de Stotz y Zamponi, 2001).

PLANTEAMIENTO

La somatostatina (SOM) es sintetizada y liberada en el neostriado por interneuronas, asimismo se han descrito sitios de unión específicos para SOM en este núcleo (Reubi 1981, Srikant y Patel, 1981). Además, se ha demostrado que este péptido modula la liberación de dopamina (Chesselet y Reisine 1983, Epelbaum, 1986, Raynor y Reisine 1992) y GABA en el estriado (Meyer, 1989) La regulación de la liberación de los neurotransmisores puede ser el resultado de la modulación de diferentes conductancias, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron:

OBJETIVOS

1. Identificar si la SOM modula conductancias de calcio en estas neuronas
2. Conocer el papel modulador de la SOM sobre las corrientes de potasio dependientes de calcio en neuronas espinosas medianas del neostriado.
3. Definir si esta modulación se correlaciona con algunas propiedades de disparo de las células espinosas

PLANTEAMIENTO

La somatostatina (SOM) es sintetizada y liberada en el neostriado por interneuronas, asimismo se han descrito sitios de unión específicos para SOM en este núcleo (Reubi 1981, Srikant y Patel, 1981). Además, se ha demostrado que este péptido modula la liberación de dopamina (Chesselet y Reisine 1983, Epelbaum, 1986, Raynor y Reisine 1992) y GABA en el estriado (Meyer, 1989) La regulación de la liberación de los neurotransmisores puede ser el resultado de la modulación de diferentes conductancias, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron:

OBJETIVOS

1. Identificar si la SOM modula conductancias de calcio en estas neuronas
2. Conocer el papel modulador de la SOM sobre las corrientes de potasio dependientes de calcio en neuronas espinosas medianas del neostriado.
3. Definir si esta modulación se correlaciona con algunas propiedades de disparo de las células espinosas

MÉTODO

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 100-120 g, las cuales se decapitaron y se aisló el cerebro. Posteriormente se obtuvieron rebanadas sagitales de 400 μm de espesor, las cuales se incubaron durante 1 hora en una solución salina de bicarbonato a un pH 7.4, con una composición en (mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 10 de glucosa, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico, oxigenados con una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 .

Posteriormente se disecaron los núcleos y se incubaron en la misma solución salina con Pronasa E (1 mg/ml), durante 20 min a 32°C. Después se realizó una disociación mecánica con pipetas Pasteur de diferentes diámetros, con una solución salina de una composición (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl_2 , 0.5 de CaCl_2 , 10 de HEPES, 10 de glucosa a un pH de 7.4 y una osmolaridad de 300 ± 5 mOsm.

La suspensión de células se incubó 10 minutos en una caja petri de 35 mm de diámetro con la solución salina similar a la descrita anteriormente, pero con 2 mM de calcio, para que las neuronas queden fijas a la base.

Corrientes de potasio

Las neuronas de 12-18 μm de diámetro se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula entera con electrodos de borosilicato de una resistencia de 3-6 $\text{M}\Omega$, con una solución interna de fosfatos de composición (en mM): 115 KH_2PO_4 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.1 Leupeptina, 2 MgATP , 0.2 NaGTP , a un pH de 7.2 con una osmolaridad de 270 ± 5 mOsm.

Para conocer los efectos de la SOM sobre las corrientes persistentes de potasio dependientes de calcio, se utilizó un protocolo de estimulación en el que se dio un pulso de voltaje que va de -80 mV a 0 mV, con una duración de 30 ms, con un potencial de mantenimiento de -90 mV, siempre en presencia de 4-aminopiridina a una concentración de 3 mM, con el objetivo de eliminar la corriente saliente transitoria. Con el fin de conocer cuales canales de potasio dependientes de calcio son modulados por la SOM se llevaron a cabo experimentos de oclusión con los bloqueadores específicos para estos canales, tales como la caribdotoxina (10 nM), la iberiotoxina (10 nM) y el tetraetilamonio (TEA, 1 mM), para bloquear los canales BK y 200 nM de apamina para bloquear los canales tipo SK.

Corrientes de Calcio

Para registrar las corrientes de calcio se utilizó BaCl_2 (5 mM) como acarreador de carga, y la solución interna contenía (en mM): 10 etilenglicol-bis-(β -aminoetil eter) ácido $\text{N,N}'$ -tetracético (EGTA), 140 N-metil-D-glucamina, 4 MgCl_2 , 40 HEPES, 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina pH 7.2 con H_2SO_4 , con una osmolaridad de 270 ± 5 mOsm

La modulación de la SOM (1 μM) sobre las corrientes entrantes se probó usando comandos de voltaje de 10 mV desde -60 a 50 mV con una duración de 30 ms cada 5 s a un potencial de mantenimiento de -80 mV a partir de las cuales se generaron curvas corriente-voltaje. Asimismo, se usaron rampas de voltaje de -80 a +50 mV al mismo potencial de mantenimiento. Para conocer cuál o cuales canales de calcio son modulados por la SOM se usaron bloqueadores específicos para los diferentes canales de calcio, tales como nitrendipina a una concentración de 5 μM para bloquear los canales L, la ω -Agatoxina-TK a una concentración de 400 nM para bloquear los canales tipo P/Q y la ω -Conotoxina GVIA para bloquear los N.

Registros Intracelulares:

Los registros intracelulares se hicieron en rebanadas sagitales de cerebro de 400 μm de espesor usando electrodos de 80-120 $\text{M}\Omega$ de resistencia, llenados con acetato de potasio. Los registros fueron obtenidos con un electrómetro de alta impedancia (Neurodata, Ins Co. NY) con un circuito activo usando técnicas estándar. El potencial de membrana de la célula fue de -80 mV y la resistencia de entrada fue de alrededor de 40 $\text{M}\Omega$. Una inyección de corriente a un potencial de mantenimiento de -60 mV, fue dado para generar el postpotencial hiperpolarizante (PPH), después de un sólo potencial de acción. Los registros fueron digitalizados, capturados sobre cintas VHS y analizados con un osciloscopio digital y un software diseñado en el ambiente LabView (National Inst TX). La amplitud del pico del PPH fue comparado antes y después de la aplicación de una toxina o droga dada. Los resultados son expresados como un porcentaje del control.

Los datos son presentados como la media \pm error estándar de la media. Los efectos de las drogas y toxinas fueron comparadas en las mismas células. Las diferencias entre las muestras fueron comparadas con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney

RESULTADOS

SOMATOSTATIN MODULATES Ca^{2+} CURRENTS IN NEOSTRIATAL NEURONS

C. VILCHIS, J. BARGAS, T. PÉREZ-ROSELLÓ, H. SALGADO and E. GALARRAGA*

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box 70-253, México City, D.F. 04510, México

Abstract—Somatostatin is synthesized and released by aspiny interneurons of the neostriatum. This work investigates the actions of somatostatin on rat neostriatal neurons of medium size (ca 6 pF). Somatostatin (1 μ M) reduces both calcium action potentials (20 mM tetraethylammonium) by ca 24% and calcium currents by ca 35%, in all cells tested. This action was produced in the presence of tetrodotoxin and in dissociated cells and was blocked by cyclo(7-aminohexapeptanoyl-phe-d-try-lys-O-benzyl-thr) acetate (CPP-1), a somatostatin receptor antagonist. Except for nitrendipine (5 μ M), several calcium channel antagonists, 1 μ M ω -conotoxin GVIA, 400 nM ω -agatoxin TK, and 1 μ M ω -conotoxin MVIIC, partially occluded somatostatin action. According to the calcium channel types known to be blocked by these antagonists, P/Q-type channels appeared to be the channels mainly modulated by somatostatin, followed by N-type channels. Since these channel types generate the afterhyperpolarizing potential in spiny neurons, we investigated the action of somatostatin on this event. Somatostatin reduces the amplitude of the afterhyperpolarizing potential by ca. 39%. This action is occluded by ω -agatoxin TK and ω -conotoxin MVIIC but not by ω -conotoxin GVIA or nifedipine. Thus, the action of somatostatin on the afterhyperpolarizing potential is mainly mediated by P/Q-type calcium channels. The block of the slow afterhyperpolarizing potential made most neurons exhibit an irregular firing mode, suggesting that ion currents other than calcium may also be affected by somatostatin.

We conclude that somatostatin exerts a direct postsynaptic effect on neostriatal neurons via the activation of somatostatin receptors. This action affects non-L-type calcium channels and therefore modifies the afterhyperpolarizing potential and the firing pattern. It is proposed that somatostatin and its analogues may have profound effects on the motor functions controlled by the basal ganglia. © 2002 IBRO Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Key words: somatostatin, calcium currents, neostriatum, afterhyperpolarization, firing pattern, P/Q-type channels, ω -agatoxin TK.

The peptide somatostatin-14 (SOM) is an important inhibitor of hormone secretion in the endocrine system (Epelbaum et al., 1994). SOM also acts as neuromodulator in the brain, where it inhibits neuronal activity and modulates transmitter release by both potentiating potassium currents and reducing calcium currents (Lewis et al., 1986; Luini et al., 1986; Mihara et al., 1987; Inoue et al., 1988; Ikeda and Schofield, 1989; Wang et al., 1989; 1990; Dryer et al., 1991; Twery et al., 1991; White et al., 1991; Schweitzer et al., 1993; Merincey et al., 1994; Ishibashi and Akaike, 1995). Actions on potassium currents hyperpolarize cells and reduce firing rate. Actions on calcium currents have been linked to inhibition of hormone and transmitter release (Rosenthal et al., 1988; Ishibashi and Akaike, 1995). L- and non-L-

type calcium currents have been reported to be decreased by SOM (Rosenthal et al., 1988; Golard and Siegelbaum, 1993; Yallent et al., 1996; Viana and Hille, 1996; Akopian et al., 2000).

SOM is found in the neostriatum in high concentrations (Sperk and Widman, 1984). It is synthesized in medium-sized aspiny interneurons (Di Figlia and Aronin, 1982; Chesselet and Graybiel, 1982; Galarraga et al., 1993). It acts via five distinct receptor subtypes. All of them have been cloned (Hoyer et al., 1995; Reisine and Bell, 1995) and might be present in the neostriatum (Martin et al., 1991).

Endogenous SOM modulates GABA release in the neostriatum (Meyer et al., 1989). If this action occurs through a direct action on spiny neurons, it may have a role in regulating motor functions (Aronin et al., 1983). However, direct actions of SOM on neostriatal neurons remain to be investigated.

The most reproducible effect of SOM in other neurons is a reduction in calcium currents (Lewis et al., 1986; Luini et al., 1986; Rosenthal et al., 1988; Ikeda and Schofield, 1989; Wang et al., 1990; Dryer et al., 1991; White et al., 1991; Golard and Siegelbaum, 1993; Merincey et al., 1994; Ishibashi and Akaike, 1995; Yallent et al., 1996; Viana and Hille, 1996). Therefore, these are the currents that we first investigated. There are several types of calcium channels in neostriatal neurons (Bargas

*Corresponding author. Tel.: +52-5-622-5621; fax: +52-5-622-5607.

E-mail address: egalarraga@fisiol.unam.mx (E. Galarraga).

Abbreviations. ω -AgTx TK, ω -agatoxin TK; AHP, afterhyperpolarizing potential; ANOVA, analysis of variance; ω -CgTx GVIA, ω -conotoxin GVIA; CPP-1, cyclo(7-aminohexapeptanoyl-phe-d-try-lys-O-benzyl-thr) acetate; ω -C1x MVIIC, ω -conotoxin MVIIC; DMSO, dimethylsulfoxide; EGTA, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; GHK, Goldmann-Hodgkin-Katz; HEPES, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2(ethanesulfonic acid); NS, not significant; SOM, somatostatin-14; TEA, tetraethylammonium; TTX, tetrodotoxin.

et al., 1994; Foebring et al., 2000) where they have different roles (Galarraga et al., 1989) N- and P/Q-type channels are essential to activate the afterhyperpolarizing potential (AHP) that regulates the firing pattern (Pineda et al., 1992; Bargas et al., 1999; Vilchis et al., 2000a). Slow sustained depolarizations sensitive to dihydropyridines and calciseptine maintain firing evoked by a brief stimuli at depolarized membrane potentials (Hernández-López et al., 1997; Hernández-López et al., 2000). Hence, the present study investigates whether SOM-14 modulates some of these calcium currents. These results have been partially presented in abstract form (Vilchis et al., 2000b).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation

Brain slices and acutely dissociated neurons were obtained as described in previous work (Hernández-López et al., 1997; Vilchis et al., 2000a,b). In brief, adult Wistar rats from our Animal House were deeply anesthetized with ether and their brains removed into ice-cold saline. All procedures were approved by the institutional animal care committee which conforms to NIH guidelines on the ethical use of animals (NIH publication No. 80, 23, revised 1978). Sagittal brain slices 350 μm thick were cut on a vibratome and placed for 1 h at room temperature into saline containing (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 11 glucose, and 0.1% of ascorbic acid (25°C; pH=7.4 with NaOH, 298 \pm 5 mOsm/l with glucose; saturated with 95% CO_2 and 5% O_2). Thereafter, slices were transferred to a recording chamber or used to obtain dissociated cells. In the second case, the dorsal neostriatum was dissected and then returned into the above saline now containing 1 mg/ml of pronase E type XIV (Sigma; St. Louis, MO, USA) at 32°C. After about 20 min of digestion, the slices were removed into a low Ca^{2+} (0.4 mM CaCl_2) saline and rinsed. Slices were then mechanically dissociated with a graded series of fired polished Pasteur pipettes. The cell suspension (2 ml) was plated into a Petri dish mounted on the stage of an inverted microscope containing 1 ml of the whole-cell recording saline (in mM): 0.001 tetrodotoxin (TTX), 130 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES and 10 glucose (pH=7.4 with NaOH; 300 mOsm/l with glucose). After 10 min the cells began to be superfused at about 1 ml/min with saline of the same composition. Neurons adhered to the bottom of the dish within 10 min.

Intracellular recordings

Intracellular recordings were performed with sharp electrodes filled with biocytin (Sigma, 1–2%) and 3 M K-acetate. Electrode DC resistances ranged from 80 to 120 M Ω . Conventional intracellular techniques used a high input impedance electrometer with an active bridge circuit. Stimulation consisted of intracellular injections of constant current steps that, once chosen, were maintained during test observations. For example, brief (15 ms) intracellular current injections were used to evoke the AHP after a single action potential (Pineda et al., 1992). In order to see a hyperpolarizing AHP, stimulus was given at a holding potential of -60 mV (Pineda et al., 1995; Hernández-López et al., 1996), by adjusting constant current. The stimulus was of threshold intensity. The spike and the AHP were elicited after the end of the stimulating current so that the electrode was not passing current when recording the AHP. For clarity, AHP figures only show representative traces with action potentials clipped. Procedures were similar to compare repetitive firing

and calcium action potentials before and after SOM or toxins, except that the duration of the stimulus was longer. Recordings were digitized, captured on VHS tapes, and analyzed off-line with the aid of software designed in the laboratory in the Lab-View environment (National Instruments, TX, USA). Results were compared before and after a given drug or toxin: e.g. AHP peak amplitudes, firing frequency and duration of the calcium spike. Results are expressed as percentage of block. Bridge balance as well as recovery periods (without D.C. current) were monitored between sample records. After recordings some neurons were injected with biocytin as previously described (Galarraga et al., 1999). All neurons identified in the present study were medium-sized spiny projection neurons.

Whole-cell recordings

Voltage-clamp recordings were performed on medium-sized neostriatal neurons (6–12 μm ; whole-cell capacitance \approx 6–7 pF) with a few or none short dendritic trunks. Larger neurons were avoided on purpose since it is known that 6–7 pF dissociated neurons overwhelmingly correspond to medium spiny projection neurons (Yan and Surmeier, 1996). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass and fire polished prior to use. The internal saline contained (in mM): 10 EGTA, 140 N-methyl-D-glucamine, 4 MgCl_2 , 40 HEPES, 2 ATP, 0.4 GTP and 0.1 leupeptin (pH=7.2 with H_2SO_4 ; 270 mOsm/l). Electrode DC resistances were 3–5 M Ω in the bath. Liquid junction potentials ($<$ 10 mV) were not corrected. Recordings were obtained with an Axon Instruments (Foster City, CA, USA) Axopatch-1D patch-clamp amplifier and controlled and monitored with a PC 586 class running pClamp (v. 5) with a 125 kHz DMA interface (Axon Instruments). After seal rupture, the series resistance ($<$ 15 M Ω) was compensated (70%) and periodically monitored. Whole-cell currents rarely exceeded 1.0 nA, thus, errors in voltage owing to inadequate compensation should not have exceeded a few millivolts. Voltage control was assessed after compensation by examining the reproducibility of current traces and tails. Cells in which current traces were not reproducible or were distorted, or with tail currents that did not decay smoothly, were discarded. The time course of SOM actions used current responses to voltage commands to -10 mV from holding potentials of -80 mV for 30 ms every 5 s, or else, used peak current measurements from the responses to voltage ramps (see below). Current-voltage relations before and after SOM and/or calcium channel antagonists were performed both with fixed voltage commands from -60 to 50 mV in 10 mV steps and with current responses to voltage ramps from -80 to 50 mV. Both methods coincide (see Fig. 2). Most figures only show representative responses to voltage ramps.

Materials

Drugs were applied with a gravity-fed system that positioned a glass capillary 200 μm from the recorded cell in the direction of superfusion flow. Solution changes were performed with a D.C.-controlled microvalve system (Lee; Essex, CT, USA). Substances used were added to the superfusate from thawed stock solutions. SOM, somatostatin-28 (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA), somatostatin receptor antagonist cyclo(-7-aminohexanoil)-phe-d-try-lys-O-benzyl-thr acetate (CPP-1) (ICN Biomedicals Research Products, Costa Mesa, CA, USA). Calcium channels antagonists: ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx GVIA), ω -agatoxin TK (ω -AgTx TK), ω -conotoxin MVIIC (ω -Ctx MVIIC) all were obtained from Peptides International (Louisville, KY, USA). Nicardipine, nifedipine, TTX and tetraethylammonium (TEA) were obtained from Sigma. Most active substances were dissolved in water to get stock solutions and added to the superfusate to give the final concentration. SOM and dihydropyridines were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, 1%), in which case control saline also contained DMSO at the same final concentration. Stock solutions were never older than a week and they were kept at $<$ -70°C .

Analysis

Activation functions were obtained as permeability plots by entering data from current-voltage relationships ($I-V$ plots) into the Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) constant field equation for current (Bargas et al., 1994):

$$P = \frac{I}{V} \cdot \frac{RT}{(zF)^2} \cdot \left\{ \frac{e^{-zFV}}{RT-1} - \frac{zFV}{RT} \right\} \frac{1}{[Ca^{2+}]_o \cdot e^{-zFV} - [Ca^{2+}]_i} \quad (1)$$

where: P = permeability in cm/s; I (current amplitude) and V (voltage commands) are taken from the $I-V$ plot, $[Ca^{2+}]_o$ = external calcium concentration, $[Ca^{2+}]_i$ = internal calcium concentration, z = valence, F = Faraday's constant, R = gas constant and T = absolute temperature in Kelvin degrees. Permeability data were then normalized to a maximal value of 1.0. Thereafter, Boltzmann functions of the form:

$$y = \frac{1}{1 + \exp(-(V - V_h)/V_c)} \quad (2)$$

where: y = normalized permeability; V = voltage; V_h = half activation voltage in mV and V_c = the slope factor of the activation plot in mV, were used to fit activation data.

Box plots (representing quartiles 1, 25, 75, 99 and the median) were used when testing the action of the somatostatin receptor antagonist CPP-1. For most treated samples mean, median and S.E.M. are reported. Statistical tests to assess a change in individual treated samples are indicated in the results: Student's t -test, Mann-Whitney's U -test or Wilcoxon's test were used depending on the samples (paired or non-paired).

However, to take into account sample to sample variance, analysis of variance (ANOVA) and non-parametric (Kruskal-Wallis) variance analysis were used to see if the differences in the percentage of SOM modulation in the presence of various Ca^{2+} channel antagonists are significant. To approximate the amount of SOM modulation for each type of Ca^{2+} channel taken separately, we first took the amount of Ca^{2+} current block by a given antagonist (nitrendipine, ω -CgTx GVIA and ω -AgTx TK) as the contribution of a given channel type to the whole-cell Ca^{2+} current (normalized to 100%). Thereafter, we compared SOM modulation on Ca^{2+} currents in the presence of different Ca^{2+} channel blockers and introduce the data into a system of linear equations:

$$\begin{aligned} 0x_1 + PQx_2 + Nx_3 &= A \\ Lx_1 + 0x_2 + Nx_3 &= B \\ Lx_1 + PQx_2 + 0x_3 &= C \end{aligned} \quad (3)$$

where L , PQ , and N are the contributions, in percentage, of each channel type to the whole-cell Ca^{2+} current. Note that 'PQ' does not indicate a product but the contribution of P/Q-type Ca^{2+} channels. The usual nomenclature (i.e. 'P/Q-type') would indicate a quotient; which, perhaps, is more misleading. Also, although not necessary, coefficients equal to zero appear in each equation. This is to symbolize a term which emphasizes the block of one channel type for each equation. This channel type corresponds to that present for the same x in the other equations of the system. Thus, one coefficient L , N or PQ is replaced by zero when the corresponding antagonist has blocked that channel type. x_1 - x_3 ($x_i < 1$) are the unknowns, that is, the values that multiply coefficients L , N and PQ in order to account for SOM modulation. In percentage, unknowns' values resulted in the ranges given at the bottom of Table 1. A , B and C represent the amount of current left (in %) in respect to the control after SOM modulation; with one of the channel types blocked. The contribution of R-type channels has been subtracted from the system constants (A , B and C) since the amount of SOM modulation upon this channel type is the only one that is known directly (after ω -C1x MVHC plus nitrendipine). The idea is that SOM modulation will be significantly less if a channel type that is a preferred target for modulation has been previously blocked by its antagonist (see Table 1).

Table 1. Partial occlusion of SOM modulation by Ca^{2+} channel antagonists

Types of channel left after the blockade % of SOM modulation of current left in each condition (mean \pm S.E.M.; median)	Whole-cell Ca^{2+} current (control)	Nitrendipine (5 μ M)	ω -CgTx GVIA (1 μ M)	ω -AgTx TK (400 nM)	ω -C1x MVHC (1 nM)	ω -C1x MVHC + nitrendipine
n	9	7	6	10	8	4
F		2.33	11.66	21.80	23.94	< 0.001
P		NS	< 0.04	< 0.001	< 0.001	< 0.001
R		L-type: 0-10%	N-type: 40-50%	P/Q-type: 60-70%		R-type: 3-20%

In the first row, used Ca^{2+} channel antagonists are indicated. In the second row the channel types that are left after addition of a given Ca^{2+} channel antagonist are indicated. The third row shows mean \pm S.E.M. (and median) of SOM modulation of Ca^{2+} currents after Ca^{2+} channel antagonists have blocked a part of the current (in percentage). Less modulation (more occlusion) occurs each time that P/Q-type channels are blocked. The fourth row indicates the number of experiments in each sample. There is one sample per column. F statistics and P values from post hoc Tukey's tests between the samples with blockers and the control sample in the fifth and sixth rows are in the fifth and sixth rows. Global $F = 17.45$ ($P < 0.001$) and global Kruskal-Wallis statistic = 39.02 ($P < 0.001$) show that SOM modulation was not the same but depended on the antagonist present. A system of equations (Experimental procedures) gave the percentage of SOM modulation for each channel type taken separately (last row).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESULTS

Somatostatin-14 modulates calcium conductance

Figure 1A shows that $1 \mu\text{M}$ SOM reduced the duration of Ca^{2+} -mediated action potentials (Galarraga et al., 1989) induced with 20 mM TEA by (mean \pm S.E.M.) $24 \pm 9\%$ (control = $193 \pm 11 \text{ ms}$ vs. $+ \text{SOM} = 147 \pm 11 \text{ ms}$; medians 188 vs. 144 ; $n=6$; $P < 0.03$, Wilcoxon's test). A similar modulation of $39 \pm 3\%$ (Fig. 1B) was observed on the Ca^{2+} -mediated action potentials induced in the presence of $1 \mu\text{M}$ TTX ($n=4$). SOM action in the presence of TTX suggests a direct postsynaptic effect. All neurons identified after these experiments ($n=5$) were medium spiny neurons.

Whole-cell voltage-clamp recordings were performed on acutely dissociated neostriatal neurons to investigate SOM action on calcium currents. Figure 2A shows representative whole-cell currents, carried by Ba^{2+} , through Ca^{2+} channels. They were evoked by depolarizing voltage commands from -80 to 50 mV (bottom) in 10 mV steps and recorded in control conditions (top) or in the

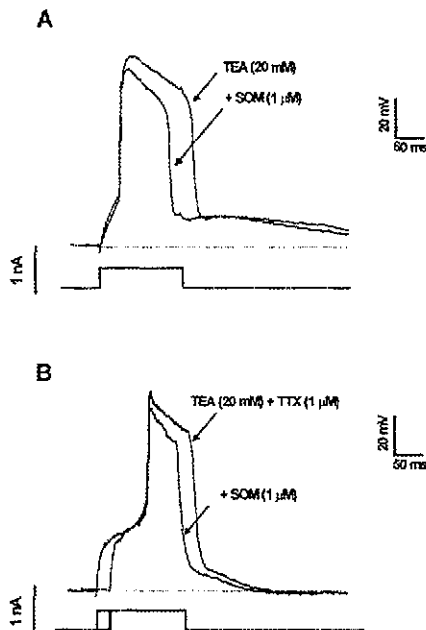


Fig. 1. SOM reduces Ca^{2+} action potentials in spiny neurons. A: SOM ($1 \mu\text{M}$) reduces the duration of Ca^{2+} action potentials evoked by depolarizing currents in the presence of 20 mM TEA. Resting membrane potential $\approx -74 \text{ mV}$. B: The effect of SOM on the Ca^{2+} action potentials is present during the addition of $1 \mu\text{M}$ TTX to the bath saline, suggesting a postsynaptic action. Resting membrane potential $\approx -73 \text{ mV}$. Regenerative potentials were obtained with intracellular recordings in adult neostriatal slices.

presence of $1 \mu\text{M}$ SOM (middle). In all cases, Ca^{2+} currents were reduced by SOM ($n=9$). The amplitude of currents evoked by a voltage command to -10 mV were measured before and during SOM: control = $242 \pm 23 \text{ pA}$ vs. $+ \text{SOM} = 162 \pm 23 \text{ pA}$; medians = 232 vs. 153 ; $P < 0.01$, Wilcoxon's test). Thus, the percentage of SOM modulation without any calcium channel antagonist was $35.4 \pm 3.5\%$ (see Table 1). This modulation will be compared to that obtained in the presence of different Ca^{2+} channel antagonists.

The modulation remained during the continued presence of SOM with little desensitization; if any. However, current amplitude partially recovered after a 30 min washout (data not shown). In some experiments somatostatin-28 was used with similar results (data not shown).

Figure 2B shows the Ca^{2+} current evoked by a depolarizing voltage ramp (-80 to 50 mV). Cell is the same as in Fig. 2A. The peak of this current was also reduced by SOM. Current-voltage relationships ($I-V$ plots) in Fig. 2C were built with responses to both ramp and step commands (from Fig. 2A, B). Note that $I-V$ plots obtained with either protocol nearly match each other. They are almost the same at -10 mV , which was the voltage chosen to measure modulation. Since these effects were obtained from dissociated neurons, the postsynaptic nature of SOM actions on medium-sized neostriatal neurons was confirmed.

Representative traces of currents before and during SOM are depicted in Fig. 3A. $I-V$ plots from SOM-sensitive currents were obtained by subtracting $I-V$ plots in the presence of SOM, from those obtained in the control condition. Activation functions were then constructed from $I-V$ plots data by using Eq. 1 (GHK equation; see Experimental procedures). Thereafter, plots were normalized to 1.0 and a Boltzmann type equation (Eq. 2, see Experimental procedures) was used to quantify voltage sensitivity. Figure 3B shows an example. It was roughly seen that voltage sensitivity for the SOM-sensitive current is not significantly different from that for the control current. Half activation voltages ($V_{1/2}$) and slope factors ($V_{0.5}$) obtained by fitting activation data to Eq. 2 were: $V_{1/2} = -11.9 \pm 2.8 \text{ mV}$ in control vs. $-9.8 \pm 3.8 \text{ mV}$ for current sensitive to SOM (not significant, NS); $V_{0.5} = 5.6 \pm 0.4 \text{ mV}$ in control vs. $5.6 \pm 0.3 \text{ mV}$ for the SOM-sensitive current (NS; $n=8$). These experiments suggest that SOM is not acting on a single type of calcium channel but that it is targeting more than one type (Bargas et al., 1994; Foehring et al., 2000).

Figure 3C shows that SOM modulation of Ca^{2+} currents is almost totally blocked in the presence of $1 \mu\text{M}$ of the SOM receptor antagonist CPP-1. Modulation in the presence of CPP-1 amounted for $6.5 \pm 1\%$ ($n=6$; $P < 0.001$ with respect to the control; Mann-Whitney's U -test). In two out of six cases, the calcium current first increased in the presence of CPP-1 alone, suggesting some constitutive activity of the receptor. Box plots of Fig. 3D compare distribution samples of percent SOM modulation in the absence and presence of CPP-1. Taken together, the results suggest that modulation occurs via specific postsynaptic SOM receptors present on medium-sized neostriatal neurons.

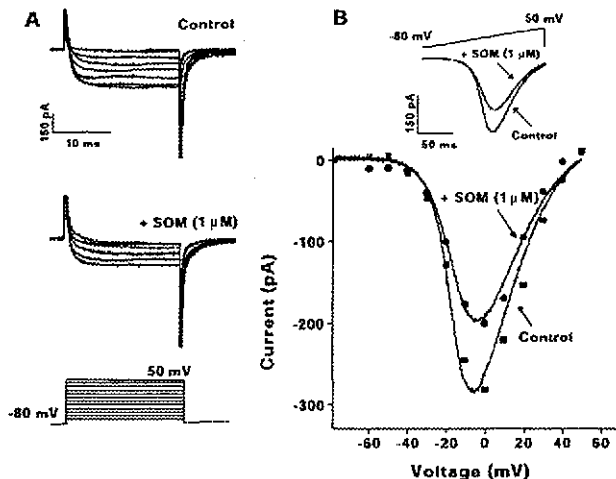


Fig. 2. SOM reduces Ca^{2+} currents in dissociated cells. A: Representative currents carried by 5 mM Ba^{2+} were evoked by the voltage protocol depicted at the bottom: voltage commands from -60 to 50 mV, in 10 mV steps, were elicited from a -80 mV holding potential. Ca^{2+} currents before SOM are depicted at the top (control). Ca^{2+} currents during SOM ($1 \mu\text{M}$) are depicted at the middle. SOM reduced the currents. B: Ca^{2+} current evoked by a depolarizing voltage ramp (from -80 to 50 mV) in the same cell. It is also reduced by SOM. Current-voltage relationships (I - V plots at bottom) were built with both voltage commands (symbols) and ramps (continuous traces) and were superimposed. Currents after step commands were measured at the end. Control currents are represented by squares; circles represent currents in the presence of SOM. A close match between ramp and step protocols is seen. Neuron was dissociated from dorsal neostriatum. $C_f = 6.5$ pF.

Calcium channels are differentially modulated by somatostatin

It has been previously shown that calcium influx into neostriatal neurons takes place through different types of calcium channel, including: N, P/Q, L and R (Bargas et al., 1994; Foehring et al., 2000). Perhaps SOM modulates some, but not all, Ca^{2+} channel types. Very selective calcium channel antagonists are available. Therefore, a significant occlusion of SOM modulation should occur if a given antagonist has previously shut down an important target channel.

SOM could modulate Ca^{2+} currents that had been previously reduced by the L-type Ca^{2+} channel antagonist nitrendipine ($5 \mu\text{M}$) (Fig. 4A). Ca^{2+} current amplitudes were 243 ± 27 pA (median = 255 pA) in the control and 178 ± 18 pA (median = 178 pA) after nitrendipine ($5 \mu\text{M}$) ($P < 0.02$; Wilcoxon's test; $n = 7$). Addition of SOM ($1 \mu\text{M}$) in the presence of nitrendipine reduced the current even more to 120 ± 14 pA (median = 125 pA) ($P < 0.02$; Wilcoxon's test; comparing current amplitude in nitrendipine vs. current amplitude in nitrendipine plus SOM). Therefore, percent block by nitrendipine was $26 \pm 2\%$, which corresponds to L-type Ca^{2+} channel contribution to the whole-cell calcium current (see below); and percent SOM modulation with L-type Ca^{2+} channels blocked was $33 \pm 1\%$ (median = 34%); which suggests that L-type channel block did not significantly reduce SOM modulation. The time course of a representative experiment (Fig. 4B) shows that nitrendipine block reaches a steady-state before applying SOM

and that SOM modulation also reaches a steady-state with no obvious desensitization during the experimental time range.

Similarly, SOM modulation was still present after the N-type channel antagonist, ω -CgTx GVIA ($1 \mu\text{M}$), took out the contribution of N-type Ca^{2+} channels from the whole-cell current (Fig. 5A, B) ($n = 6$). Thus, control current was 154 ± 20 pA (median = 164) and after ω -CgTx GVIA ($1 \mu\text{M}$) it was 93 ± 11 pA (median = 96) ($P < 0.03$; Wilcoxon's test). Adding SOM in the presence of ω -CgTx GVIA reduced the current to 70 ± 8 pA (median = 71) ($P < 0.03$; Wilcoxon's test comparing current amplitudes in ω -CgTx GVIA to those obtained in ω -CgTx GVIA plus SOM). These results yield a percent contribution of N-type Ca^{2+} channels to the whole-cell current of about $37 \pm 5\%$ (median = 32%). After N-type Ca^{2+} channel blockade, percent SOM modulation decreased significantly to $24 \pm 3\%$ (median = 26%; see significance below and in Table 1); suggesting a partial occlusion.

The P/Q-type Ca^{2+} channel antagonist, ω -AgTx IK (400 nM) (Fig. 5C, D), took away most P/Q-type channels from the whole-cell Ca^{2+} current (Bargas et al., 1994). Control current was 267 ± 36 pA (median = 268 pA) and current left after ω -AgTx IK was 154 ± 26 pA (median = 125 pA) ($P < 0.005$; Wilcoxon's test). Thus, mean percent contribution of P/Q-type Ca^{2+} channels to the whole-cell Ca^{2+} current is about $42 \pm 4\%$ (median = 43%). In this condition, addition of SOM did not have much effect ($n = 10$), current was reduced to 135 ± 25 pA (median = 112 pA) ($P < 0.005$;

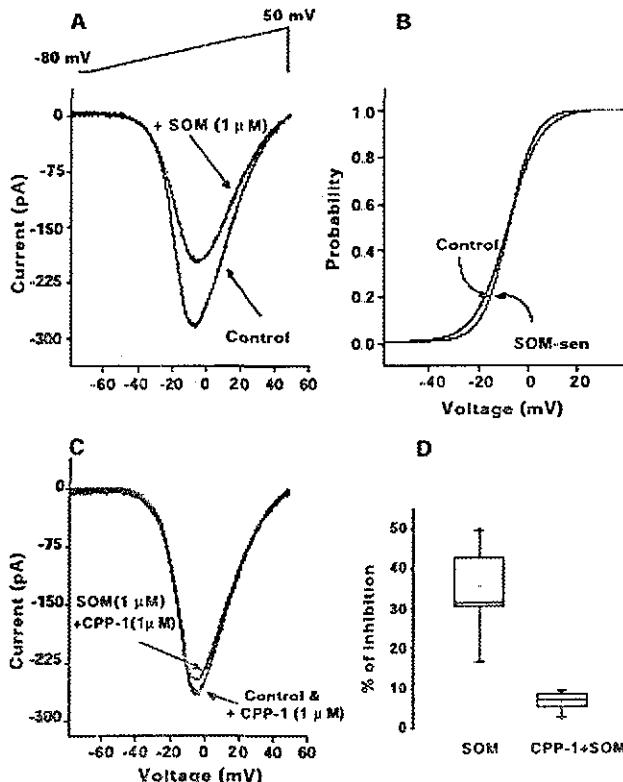


Fig. 3. Voltage dependence of SOM-modulated currents and receptor specificity. A: I - V plots were obtained from responses to ramp commands (at the top), as in Fig. 2. SOM reduces Ca^{2+} currents. B: I - V plot of current sensitive to SOM was obtained by subtracting current left after SOM from control current. Then, permeability plots were built by transforming I - V plots with Eq. 1 (GHK equation). Note that SOM-sensitive current has a voltage dependence similar to the control current. Half activation voltages and slope factors were obtained by fitting Eq. 2 (Boltzmann) to activation data. Plots were normalized to 1.0. $V_{1/2} = -11.9 \pm 2.8$ mV in control vs. -9.8 ± 3.8 mV for current sensitive to SOM (NS; $n = 8$). $V_c = 5.6 \pm 0.4$ mV in control vs. 5.6 ± 0.3 mV for the SOM-sensitive current (NS; $n = 8$). C: The SOM antagonist CPP-1 (1 μM) blocked SOM modulation of the Ca^{2+} current. D: Box plots depict whole sample distributions in both cases. Limits of boxes represent quartiles 25 and 75, while middle bar represents the median. Limits of hinges represent quartiles 1 and 99. Note that distributions do not overlap.

Wilcoxon's test). This shows that once P/Q-type channels were taken out, SOM modulation decreased to $14 \pm 2\%$ (median = 15%; see significance below). This suggests that P/Q-type channels are a main target for SOM modulation. Note, however, that some modulation remains. No case showed desensitization of SOM action during the experiment.

In contrast to what happened after L-type Ca^{2+} channel blockade, the block of non-L-type Ca^{2+} channels did reduce SOM modulation. ω -Ctx MVIIC (1 μM), a blocker of, supposedly, N- and P/Q-type channels, reduced Ca^{2+} current amplitude from 169 ± 22 pA (median = 179 pA) to 96 ± 14 pA (median = 83 pA; $n = 8$; $P < 0.02$; Wilcoxon's test). This yields a $42 \pm 4\%$ percent of ω -Ctx MVIIC-sensitive current. In ω -Ctx

MVIIC, SOM modulation of Ca^{2+} currents decreased current amplitude to 81 ± 11 pA (median = 71 pA) ($P < 0.02$; Wilcoxon's test with respect to current in ω -Ctx MVIIC alone). Thus, percent of SOM modulation in ω -Ctx MVIIC was reduced to $15 \pm 1\%$ indicating a partial occlusion.

SOM was finally tested on R-type Ca^{2+} channels by adding ω -Ctx MVIIC (1 μM) and nitrendipine (5 μM) to the same preparation (Fochring et al., 2000) before adding SOM. Figure 6C, D show that SOM modulated the Ca^{2+} current left after addition of ω -Ctx MVIIC plus nitrendipine, i.e. the R-type current. Current amplitudes before and after ω -Ctx MVIIC plus nitrendipine were ($n = 4$): 267 ± 9 pA (median = 268 pA) and 95 ± 25 pA (median = 88 pA). This suggests that R-type Ca^{2+} chan-

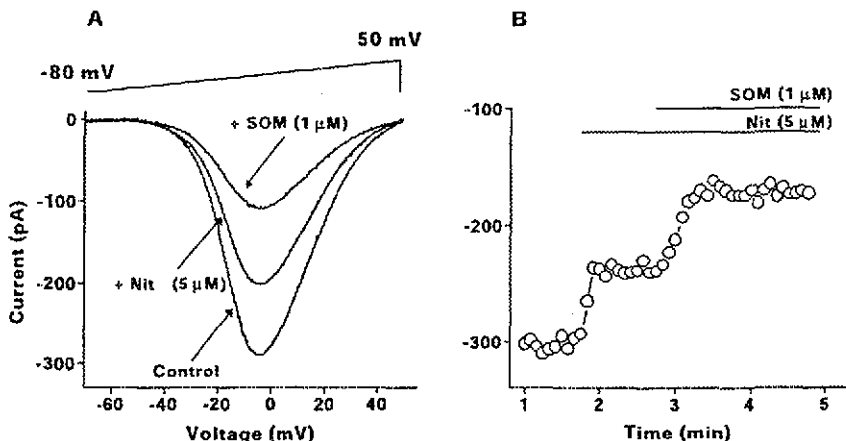


Fig. 4. SOM modulates Ca^{2+} currents in the presence of nifedipine. A: *I-V* plots built from responses evoked as in previous figures. First, the contribution of L-type Ca^{2+} channels was shut down from total Ca^{2+} current by using a saturating concentration of nifedipine (Nit; 5 μM). Next, SOM (1 μM) was tested on the current left after nifedipine. Nifedipine did not occlude SOM modulation. B: Time course of the experiment. Note that the actions of both nifedipine and SOM reach steady-state. SOM action did not desensitize during the experiment.

nels contribute to $35 \pm 8\%$ of the total current. In this condition, percent of SOM modulation was $12 \pm 4\%$, showing that SOM modulated R-type Ca^{2+} channels in a small degree.

As shown in representative time courses (Figs. 4B, 5B, D, 6B, D), SOM modulation was exerted after the block by Ca^{2+} channel antagonists had reached a steady-state. Nevertheless, SOM modulation did not show fast desensitization in any experiment. The results, given in percentage, are summarized in Table 1. No matter which Ca^{2+} channel antagonist was present, each separate sample exhibited a significant SOM modulation (see above). However, the amount of modulation was not the same after different Ca^{2+} channel antagonists. To evaluate if these differences in modulation were significant, an ANOVA was applied. A global *F* ratio of 17.35 (*df* 5 and 38; $P < 0.001$) shows that variance between samples was much larger than variance intrinsic to the samples. In fact, ANOVA did not show significant differences between mean Ca^{2+} current amplitudes taken from all control samples. The one-way Kruskal-Wallis statistic also showed significance: 29.02 (44 cases; $P < 0.001$) confirming that SOM does not target all Ca^{2+} channel types equally. Individual values of *F* and *P* are shown in Table 1. These represent post hoc Tukey's tests comparing each sample to the control sample which represents SOM modulation without any Ca^{2+} channel antagonist.

Since SOM modulation was different depending on the Ca^{2+} channel antagonist that preceded SOM application, it would be of interest to know how much modulation is targeted to individual channel types. To approximate these values, the system of equations (Eq. 3) described in Experimental procedures was used with: (a) the per-

cent contribution of each channel type to total current making up coefficients *L*, *N* and *PQ*, and (b) the percent of SOM modulation remaining after L-, N- or P/Q-type channels have been blocked making up constants *A*, *B* and *C*.

Contribution of R-type channels was subtracted from the constants together with SOM modulation of R-type channels, since these values were known directly. Also, constants were left to vary in an amount equal to the SEM around the mean percent modulation (Table 1). This analysis yielded approximates to percent modulation for each channel type (see Table 1 and Discussion) that satisfied the system. It was found that SOM preferentially targeted P/Q-type channels, but that N- and R-types are also modulated (see Discussion).

The afterhyperpolarization is sensitive to somatostatin

Ca^{2+} entry through P/Q-type Ca^{2+} channels is in charge of activating the outward currents that underlie the AHP in these cells (Vilchis et al., 2000a). Therefore, intracellular recordings were performed to observe the action of SOM on the AHP that follows a single action potential. Action potentials and AHPs were induced by a brief depolarizing pulse from -60 mV (Fig. 7A, top). SOM (1 μM) decreased peak AHP amplitude in all cells tested by $39 \pm 6\%$ ($n = 10$; $P < 0.001$; Wilcoxon's test). Figure 7B shows superimposed AHP records obtained before and during SOM application (action potentials are clipped) in a representative experiment. Similarly, SOM was tested on the AHP of cells subject to the action of different Ca^{2+} channel blockers (Fig. 7C-F). Neither 5 μM nifedipine (Fig. 7C) nor 1 μM ω -CGTx GVIA (Fig. 7D) occluded the action of

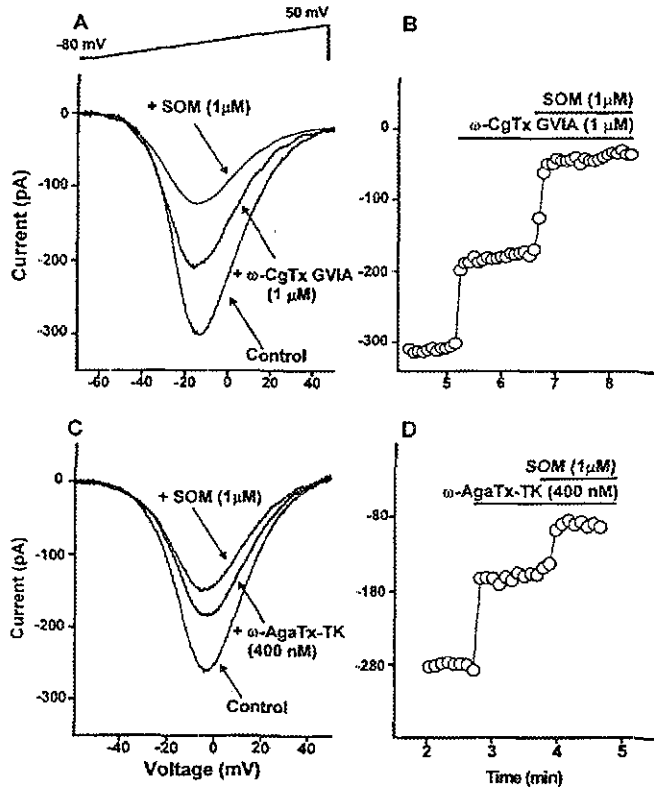


Fig. 5. SOM modulation of Ca²⁺ currents is reduced in the presence of ω-CgTx GVIA or ω-AgTx TK. A: *I-V* plots built from responses to ramp commands as before. First, contribution of N-type Ca²⁺ channels was shut down with a saturating concentration of ω-CgTx GVIA (1 μM). Next, SOM (1 μM) was tested on the current left after ω-CgTx GVIA. The toxin does not occlude SOM modulation. B: Time course of the experiment in A. Note that the actions of both ω-CgTx and SOM reach steady-state. C: *I-V* plots were built as in A. The contribution of P/Q-type Ca²⁺ channels was shut down from total Ca²⁺ current by using a near saturating concentration of ω-AgTx TK (400 nM). Next, SOM (1 μM) was tested on the current left after ω-AgTx TK. Agatoxin does not completely occlude SOM modulation but reduces it. D: Time course of the experiment in C. Note that the actions of both ω-AgTx and SOM reach steady-state. In all cases, SOM action does not desensitize in the minutes time frame.

SOM on the AHP since SOM modulation was $40 \pm 6\%$ ($n = 10$) and $37 \pm 10\%$ ($n = 6$), in both cases, respectively (NS).

However, both ω-AgTx TK (400 nM) and ω-Ctx MVIIC (1 μM) reduced AHP modulation. Modulation remaining after ω-AgTx TK (Fig. 7E) or ω-Ctx MVIIC (Fig. 7F) was $17 \pm 3\%$ ($n = 7$; $P < 0.006$; Student's *t*-test) and $15 \pm 2.5\%$ ($n = 4$; $P < 0.004$; Student's *t*-test), respectively. These results show that SOM modulates the AHP and confirm that P/Q-type Ca²⁺ channels are the main target for SOM modulation in medium-sized neostriatal neurons.

A modulation that reduces the AHP may increase the firing rate by reducing interspike intervals. However, SOM is mostly known as an inhibitory neuromodulator.

Moreover, it reduces striatal GABA release (Meyer et al., 1989). Thus, in order to see what would be the impact of the above described modulation on the evoked discharge, the action of SOM was tested on repetitive firing elicited by a step depolarization (Fig. 8A–D). In some cells (ca. 38%; 5/13 neurons) SOM increased the number of action potentials evoked with the same current (Fig. 8A, B). However, the most common action of SOM was a change in the firing pattern, from a regular non-adapting firing to an irregular doublets-like firing (ca. 54%; 7/13) (Fig. 8C, D). Moreover, when recordings lasted long enough, it was frequently seen, after a time interval of 1–5 min, that regular firing cells that first responded with an increase in firing frequency, would enter into the irregular firing mode. In fact, the fast AHP (Pineda et

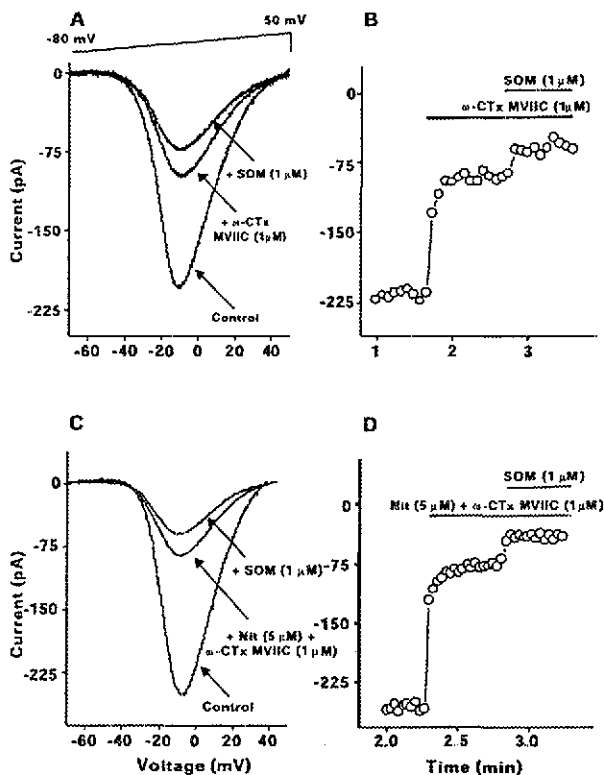


Fig. 6. SOM modulation of Ca²⁺ currents is partially occluded in the presence of either ω-CTx MVIIC alone or ω-CTx MVIIC and nifedipine given together. A: I-V plots built as in Figs. 4 and 5. The contribution of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels was blocked using a saturating concentration of ω-CTx MVIIC (1 μM). Next, SOM (1 μM) was tested on the current left after ω-CTx MVIIC. Only a small SOM modulation remains. B: Time course of the experiment in A. C: The contribution of N-, P/Q- and L-type Ca²⁺ channels was blocked by using a combination of ω-CTx MVIIC (1 μM) plus nifedipine (Nif; 5 μM). Therefore, only R-type channels were left. SOM (1 μM) was then tested upon the current going through R-type Ca²⁺ channels. Apparently, SOM had a small effect on R-type Ca²⁺ channels. D: Time course of the experiment in C. Time courses also show that during these minutes lasting experiments errors due to run down may be small.

al., 1992) was increased in irregular firing cells although the slow AHP (Pineda et al., 1992) was decreased in all cells (unpublished). This suggests a complex action of SOM on the AHP. Thus, it is probable that the increase in firing is only a transient or initial response. When it appeared, the increase in firing frequency was about $34 \pm 4\%$ (218 ± 1 Hz in control to 296 ± 2 Hz with SOM; $n = 5$). All neurons identified after these current-clamp experiments ($n = 5$) were medium spiny projection neurons.

DISCUSSION

SOM is made and released by neostriatal interneurons. The present study demonstrates a direct postsynaptic action of SOM on medium-sized neostriatal neurons.

There are reasons to believe that most neurons recorded in the present study were medium spiny projection neurons. First, all neurons identified after current-clamp experiments were medium spiny neurons and current-clamp experiments correlated well with voltage-clamp experiments. In addition, control firing pattern of neurons recorded in current-clamp experiments agrees with what has been reported, by several investigators, on medium spiny neurons. Second, voltage-clamp experiments with dissociated neurons were restricted to medium-sized neurons (6–7 pF) that mostly correspond to medium spiny neurons (Yan and Surmeier, 1996). Other studies made on these neurons have described the same inward currents described in identified medium spiny neurons (e.g. Bargas et al., 1994). Third, medium spiny neurons are the most abundant in the neostriatum. Accordingly, we would like to posit that the present

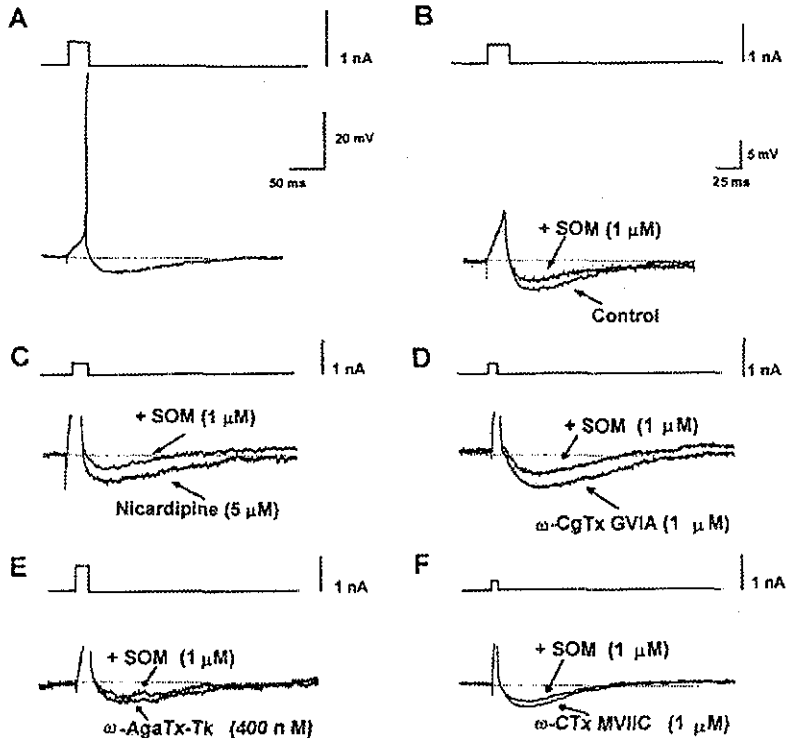


Fig. 7. SOM reduces the AHP in spiny neurons. A: A single action potential was evoked with a brief depolarizing pulse at a membrane potential of about -60 mV. The AHP that follows the action potential is more negative than the holding membrane potential by about 5 mV. B: The AHP in A was reduced by SOM ($1 \mu\text{M}$). Action potentials were clipped for clarity. C-F: The AHP after a single action potential was first reduced by a Ca^{2+} channel antagonist and thereafter SOM was applied. Notice that only $\omega\text{-AgTx-Tk}$ and $\omega\text{-CTx MVIIC}$ occluded SOM modulation of the AHP.

work mostly describes the postsynaptic actions of somatostatin on medium spiny projection neurons.

Therefore, most likely, SOM modulates voltage-activated Ca^{2+} conductances of neostriatal projection neurons. This was demonstrated on both Ca^{2+} action potentials elicited in neurons with dendritic arbors and in Ca^{2+} currents recorded in dissociated cells. The effect was direct since it was demonstrated during TTX in the slice and on dissociated cells deprived of synaptic contacts. The effect was specific to SOM receptors since it could be blocked by the specific antagonist CPP-1. On the other hand, SOM modulation of Ca^{2+} currents exhibited no fast desensitization in the present conditions and amounted to 35% of the total Ca^{2+} current (Table 1).

It is therefore concluded that medium-sized neostriatal neurons are a target for SOM released by somatostatin-ergic interneurons. The activation of specific SOM postsynaptic receptors modulates ion conductances and firing pattern. The effects are long-lasting. The signaling mechanisms and actual receptor types involved in this modu-

lation need further experimental work to be elucidated. It is then clear that SOM analogues deserve attention for testing on motor functions and the therapeutics of motor disease.

Ca^{2+} channels are differentially modulated by somatostatin

Neostriatal neurons and, in particular, medium spiny neurons, express an array of Ca^{2+} channel types: L, N, P/Q and R (Bargas et al., 1994; Fochring et al., 2000). Evidence is accumulating showing that each Ca^{2+} channel type has a specific role to play in membrane excitability and cell function (Hernández-López et al., 1997, 2000; Vilechis et al., 2000a). Very selective antagonists are available to block specific channel types. However, when adding the blockage (in %) produced by each channel antagonist to the whole-cell Ca^{2+} current, the sum is larger than 100%. If it is assumed that the antagonists' concentrations used here mainly block a specific channel

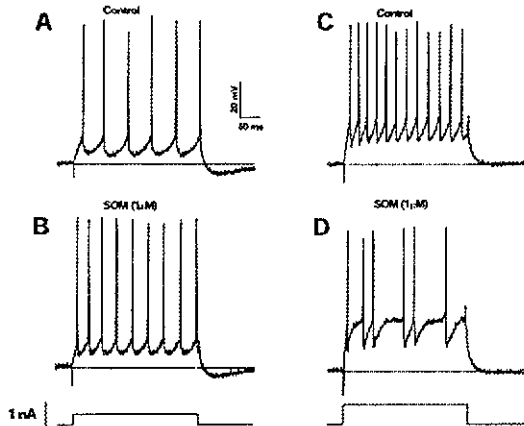


Fig. 8. SOM modulates the firing pattern. A: A train of action potentials was evoked with a depolarizing current step (at the bottom). B: SOM increased the number of action potentials evoked with the same current in this cell. C-D: In most neurons, however, SOM changed the firing pattern of medium spiny neurons from regular to irregular with doublets

type, the reason for this superadditivity might be biological variance, i.e. the percent contribution of each channel type varies from cell to cell. If one accepts this assumption, the normalization of the block by each antagonist (to 100%) would yield the mean percent contribution of each channel type to the total current: L = 19%; N = 26%, P/Q = 30% and R = 25% (sum = 100%); under the present experimental conditions. These values may be introduced as coefficients (L, N, P/Q) in Eq 3 (see Experimental procedures). Mean percent contribution of R-type channels was measured directly after adding ω -Ctx MVIIC plus nifedipine to the bath saline (Fochring et al., 2000). After normalization, this value may then be subtracted from the constants (A-C in Eq 3) in order to reduce the system to three equations.

ANOVA revealed that the amount of SOM modulation is different depending on the previous block by a selective Ca^{2+} channel antagonist (Table 1). In addition, no single Ca^{2+} channel antagonist occluded completely the action of SOM and mean percent modulation without Ca^{2+} channel antagonists was 35% (Table 1), an amount that is larger than the percent contribution of any channel type taken separately (see above). Therefore, we conclude that SOM modulates more than one Ca^{2+} channel type. It is also understood that a larger occlusion of SOM modulation should occur if the channel type blocked by a given antagonist is a main target for the modulation.

For the present case, if channels blocked belong to the N-type, SOM reduces the current left by 24%. But if the current taken out belongs to the P/Q-type, modulation fell to 15% (see Table 1). On the other hand, mean percent modulation of R-type channels was about 12% while the block of L-type channels did not change SOM modulation significantly. The system of Eq 3

was fed with these data (Experimental procedures) and it found a set of x values that explain all these percentages simultaneously. However, initial values were introduced with a range that includes standard error for each mean modulation (A-C). Thus, for a mean percent modulation without Ca^{2+} channel antagonists of 35%, the current left after modulation is 65% of the control and the factors (x values in system of Eq. 3) multiplying the percent contribution of each channel type (see above) would be $L(0.9)+N(0.5)+PQ(0.3)+R(0.8) \approx 65$ in order to satisfy the system of equations. Thus, for example, $x=0.3$ would correspond to a 70% modulation of P/Q-type channels. However, slightly different values would also satisfy the results since coefficients are left to vary according to experimental error, e.g. $L(0.99)+N(0.42)+PQ(0.23)+R(0.9) \approx 65$. However, all values agreed in that lowest x values correspond to N- and P/Q-type channels. Hence, the last row in Table 1 gives a range of SOM modulation (in %) for each channel type that takes into account these approximations. These values predict the percent of SOM modulation for each channel type if they could be tested in isolation.

From values in Table 1, the predicted order of importance for SOM modulation upon the different channel types is $P/Q > N > R \gg L$. Similar inhibition of N- and P/Q-type Ca^{2+} channels has been reported in amygdaloid neurons (Viana and Hille, 1996). If the same receptors modulate all channel types, or if different signaling cascades are used for the different channels, is a matter of future investigation.

Modulation of Ca^{2+} channels influence the excitability of spiny neurons

Calcium influx is important for spike generation and firing patterning in neostriatal neurons (Rosenthal et al.,

1988; Galarraga et al., 1989; Hernández-López et al., 1997, 2000) In particular, it activates the AHP that regulates the frequency and threshold for repetitive firing (Galarraga et al., 1989; Pineda et al., 1992) The present experiments revealed that Ca^{2+} channels modulated by SOM are those in charge of activating Ca^{2+} -dependent K^+ currents (Bargas et al., 1999) and the AHP (Pineda et al., 1992; Vilchis et al., 2000a).

It was found that SOM reduces the AHP suggesting a modulation of excitability and discharge patterning. As expected, ω -AgTx TK and ω -Ctx MVIIIC greatly occluded SOM action on the AHP.

However, a transient increase in firing frequency due to the reduction in the AHP was only observed in a minority of tested neurons. In most neurons studied, SOM changed the firing pattern of spiny neurons from a regular to an irregular mode. It is then concluded that modulation of Ca^{2+} currents may not be enough to explain SOM action on excitability. In fact, unpublished data from our laboratories involve a differential modulation of potassium conductances. Thus, the effects on excitability appear to be complex and due to the combined action on various conductances. Additionally, presynaptic effects of SOM could also be present to explain effects on GABA release (Meyer et al., 1989).

CONCLUSIONS

The present results strongly suggest that somatostatin activates somatostatinergic postsynaptic receptors in medium spiny neurons. The activation of these receptors brings about the reduction of Ca^{2+} currents, mainly of the P/Q- and N-types. As a consequence of the action on these Ca^{2+} conductances, the AHP is modulated. However, this modulation is not converted into an increase of evoked discharge, although some neurons do show this behavior temporarily. On the contrary, the effects of SOM on firing were more complicated and could be described as a change in firing pattern, from regular to an irregular mode. This suggests that SOM is modulating other ion conductances besides the Ca^{2+} ones. The implications of this modulation on motor functions need to be elucidated. It is suggested from these results that somatostatin released by somatostatinergic interneurons may affect the neostriatal output.

Acknowledgements—We wish to thank Dagoberto Tapia for technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM grant nos. IN202100 and IN202300 to E.G. and J.B., respectively, by CONACyT-México grant no. 31839-N to J.B., by The Millennium Research Initiative grant no. W-8072 and the FIRCA-NIH grant no. TWO1214-01 to J.B. and E.G.

REFERENCES

- Akopian, A., Johnson, J., Gabriel, R., Brecha, N., Witkovsky, P., 2000. Somatostatin modulates voltage-gated K^+ and Ca^{2+} currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J. Neurosci.* 20, 929–936.
- Aronin, N., Cooper, P.E., Lorenz, L.J., Birth, E.D., Sagar, S.M., Leeman, S.E., Martin, J.B., 1983. Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 13, 519–526.
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., Surmeier, D.J., 1994. Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14, 6667–6686.
- Bargas, J., Ayala, G., Vilchis, C., Pineda, J.C., Galarraga, E., 1999. Ca^{2+} -activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88, 479–488.
- Chesselet, M.F., Graybiel, A.M., 1982. Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: Evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17, 107–126.
- Di Figlia, M., Aronin, N., 1982. Ultrastructural features of somatostatin immunoreactivity in neurons in the rat caudate nucleus. *J. Neurosci.* 2, 1267–1274.
- Dryer, S.E., Dourado, M.M., Wisgirda, M.E., 1991. Properties of Ca^{2+} currents in acutely dissociated neurons of the chick ciliary ganglion: inhibition by somatostatin-14 and somatostatin-28. *Neuroscience* 44, 663–672.
- Epelbaum, J., Dournaud, P., Fodor, M., Viollet, C., 1994. The neurobiology of SRIF. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8, 25–44.
- Foehring, R.C., Mermelstein, P.G., Song, W.J., Ulrich, S., Surmeier, D.J., 2000. Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 84, 2225–2236.
- Galarraga, E., Bargas, J., Sierra, A., Aceves, J., 1989. The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* 75, 157–168.
- Galarraga, E., Kítai, S.T., Surmeier, D.J., 1993. Somatostatin- and Substance P-like immunoreactivity in rat neostriatal cultures. *Dev. Neurosci.* 16, 61–66.
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Tapia, D., Reyes, A., Bargas, J., 1999. Action of Substance P (Neurokinin-1) receptor activation on rat neostriatal projection neurons. *Synapse* 33, 26–35.
- Golard, A., Siegelbaum, S.A., 1993. Kinetic basis for the voltage-dependent inhibition of N-type calcium current by somatostatin and norepinephrine in chick sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 13, 3884–3894.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Reyes, A., Galarraga, E., 1996. Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *NeuroReport* 7, 454–456.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A., Galarraga, E., 1997. D_1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{2+} conductance. *J. Neurosci.* 17, 3334–3342.
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Pérez-García, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., Surmeier, D.J., 2000. D_2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability through a novel PLC β 1/IP3/calcineurin signaling cascade. *J. Neurosci.* 20, 8987–8995.
- Hoyer, D., Bell, G.L., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.P.A., O'Carroll, A.M., Patel, Y.C., Schonbrunn, A., Taylor, J.E., Reisine, T., 1995. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 86–88.
- Ikeeda, S., Schofield, G., 1989. Somatostatin blocks a Ca^{2+} current in rat sympathetic ganglion neurons. *J. Physiol.* 409, 221–240.
- Inoue, M., Nakajima, S., Nakayama, Y., 1988. Somatostatin induces an inward rectification in rat locus coeruleus neurons through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *J. Physiol. (Lond)* 407, 177–198.
- Ishibashi, H., Akaike, N., 1995. Somatostatin modulates high-voltage-activated Ca^{2+} channels in freshly dissociated rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 74, 1028–1036.

- Lewis, D., Weight, F.F., Luini, A., 1986 A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium currents by somatostatin on a pituitary cell line. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9035-9039.
- Luini, A., Lewis, D., Guild, S., Schofield, G., Weight, F., 1986 Somatostatin, an inhibitor of ACTH secretion, decreases cytosolic free calcium and voltage-dependent calcium currents in a pituitary cell line. *J. Neurosci* 6, 3128-3132.
- Martin, J.L., Chesselet, M.F., Raynor, K., Gonzalez, C., Reisine, T., 1991. Differential distribution of somatostatin receptor subtypes in rat brain revealed by newly developed somatostatin analogs. *Neuroscience* 41, 581-593.
- Meriny, S., Gray, D., Pilar, G., 1994 Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current modulated by α GMP-dependent protein kinase. *Nature* 369, 336-339.
- Meyer, D.K., Conzelmann, U., Schultzeiss, K., 1989 Effects of somatostatin-14 on the *in vitro* release of [3 H] GABA from slices of rat caudate putamen. *Neuroscience* 28, 61-68.
- Mihara, S., North, R., Suprenant, A., 1987. SRIF increases an inward rectifying potassium conductance in guinea-pig submucous plexus neurons. *J. Physiol. (Lond)* 390, 335-355.
- Pineda, J.C., Galarraga, E., Bargas, J., Cristancho, M., Acoves, J., 1992. Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 68, 287-294.
- Pineda, J.C., Bargas, J., Flores-Hernández, J., Galarraga, E., 1995 Muscarinic receptors modulate the after-hyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 271-277.
- Reisine, T., Bell, G.I., 1995. Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience* 67, 777-790.
- Rosenthal, W., Hescheler, J., Klaus-Dieter, H., Spicher, K., Trautwein, W., Schultz, G., 1988 Cyclic AMP-independent, dual regulation of voltage-dependent Ca^{2+} currents by LHRH and somatostatin in pituitary cell line. *EMBO J.* 7, 1627-1633.
- Sperk, G., Widman, R., 1984 Somatostatin precursor in the rat striatum: changes after local injection of kainic acid. *J. Neurochem.* 45, 1441-1447.
- Schweitzer, P., Madamba, S., Champagnat, J., Siggins, G.R., 1993. Somatostatin inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons: mediation by arachidonic acid and its metabolites. *J. Neurosci.* 13, 2033-2049.
- Tallent, M., Iliopoulos, G., O'carroll, A.M., Lolait, S.J., Dichter, M., Reisine, T., 1996 Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience* 71, 1073-1081.
- Twery, M.J., Wong, L.A., Gallagher, J.P., 1991 Somatostatin induced hyperpolarization of septal neurons is not blocked by pertussis toxin. *Eur. J. Pharmacol.* 192, 87-291.
- Viana, F., Hille, B., 1996. Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. *J. Neurosci.* 16, 6000-6011.
- Vilchis, C., Bargas, J., Ayala, X., Galván, E., Galarraga, E., 2000a Ca^{2+} channels that activate Ca^{2+} dependent K^+ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95, 745-752.
- Vilchis, C., Perez-Roselló, I., Saigado, H., Bargas, J., Galarraga, E., 2000b. Somatostatin modulates Ca^{2+} currents in neostriatal spiny neurons: impact on evoked firing. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26, 1980.
- Wang, H., Bogen, C., Reisine, T., Dichter, M., 1989. Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9616-9620.
- Wang, H., Reisine, T., Dichter, M., 1990. Somatostatin-14 and somatostatin-28 inhibit calcium currents in rat neocortical neurons. *Neuroscience* 38, 335-342.
- White, R., Schönbrunn, A., Armstrong, D., 1991. SRIF stimulates Ca^{2+} activated K^+ channels through protein phosphorylation. *Nature* 351, 570-573.
- Yan, Z., Surmeier, D.J., 1996. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca^{2+} currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J. Neurosci.* 16, 2592-2604.

(Accepted 20 September 2001)

MODULACIÓN DE CORRIENTES DE POTASIO POR SOMATOSTATINA

En neuronas del neocórtex la frecuencia y el patrón de disparo son regulados por el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue al potencial de acción. El PPH en estas células se caracteriza por presentar una fase rápida de 2 ms de duración, generada por la activación de canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia (BK). Y una fase lenta de 250 ms de duración, provocada por los canales de baja conductancia (SK) (Pineda, et al., 1992).

El PPH es blanco de múltiples tipos de neuromoduladores que regulan el patrón de disparo de diferentes tipos neuronales (Brown 1990, Sah 1996).

Con el objetivo de probar si la SOM modula el PPH en estas neuronas, se hicieron registros intracelulares en rebanadas de rata de 400 micras de espesor, para lo cual se dio un pulso breve de corriente para producir un sólo potencial de acción, seguido por su postpotencial hiperpolarizante. En la figura 9 se muestran las dos fases del PPH, la fase rápida que dura 2 ms y la fase lenta que llega a durar hasta 250 ms. La aplicación de 1 μ M de SOM-14 en el medio produjo un efecto dual sobre el PPH observándose un aumento en la parte inicial ($33.4 \pm 0.7\%$) y una reducción en la parte lenta ($17.5 \pm 0.8\%$) (Fig. 9A). La disminución de la fase lenta del PPH observada se refleja en un aumento en la frecuencia de disparo provocada por un pulso despolarizante de corriente de 300 ms de duración a un potencial de mantenimiento de -55 mV ($n=5$), (Fig. 9B). Cabe señalar que resultados similares fueron obtenidos utilizando la SOM-28, por lo que en los experimentos subsiguientes se utilizó SOM-14.

Dado que el PPH es un evento dependiente de la activación de los canales de potasio activados por calcio, decidimos estudiar si la SOM modula estos canales. Para este propósito se hicieron registros de fijación de voltaje en la configuración de célula entera.

La corriente saliente fue generada por pulsos despolarizantes de 10 mV desde -60 a 30 mV con una duración de 250 ms, con 5 ms entre cada pulso, a un potencial de mantenimiento de -80 mV. La corriente transitoria fue eliminada con 4-AP a una concentración de 3 mM (Nisenbaum et al 1996). La corriente sostenida está dada por el rectificador retardado (30%), y por los canales de potasio dependientes de calcio BK y SK, con una contribución del 30% cada uno (Bargas et al 1999). La corriente sostenida fue aumentada en un 35% por la aplicación de la SOM-14 a una concentración final de 1 μ M ($n= 6$). En la fig. 10A se muestran los trazos representativos de las corrientes antes y después de la aplicación de la SOM. La relación corriente-voltaje que se generó a partir de éstas, muestra que la SOM afectó el umbral de activación de la corriente (fig. 10B).

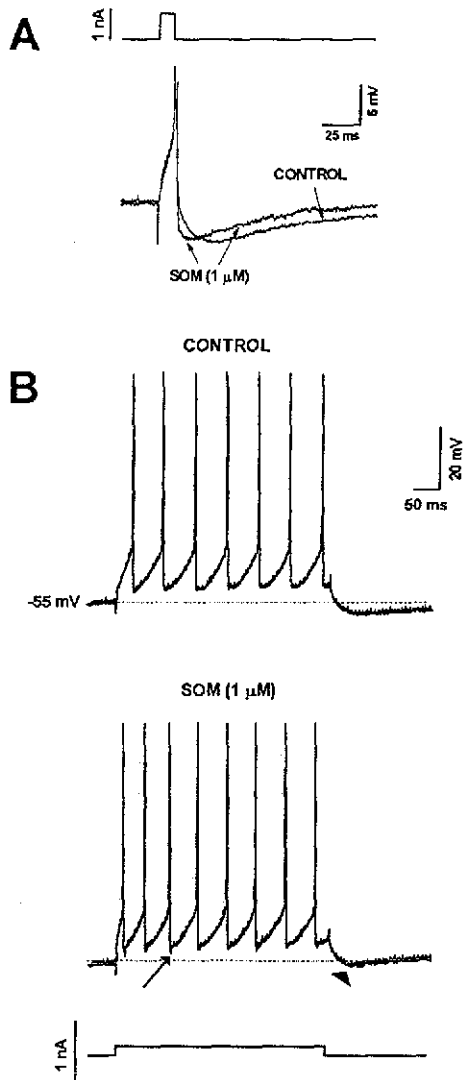


Fig 9. Efecto de la SOM sobre el PPH en neuronas de proyección del neostriado. A Potencial de acción seguido por su PPH, note el aumento en la fase rápida y la disminución de la fase lenta del PPH. B. La SOM provocó un aumento en la frecuencia de disparo.

El curso temporal del efecto de la SOM sobre la amplitud de la corriente provocada por un pulso de voltaje despolarizante de -60 a 30 mV con una duración de 30 ms y a un potencial de mantenimiento de -80 mV, es mostrado en la figura 10C note que el efecto máximo se alcanza en 1 minuto aproximadamente después de la aplicación del péptido, además se observa que no hay desensibilización del receptor durante el tiempo de registro

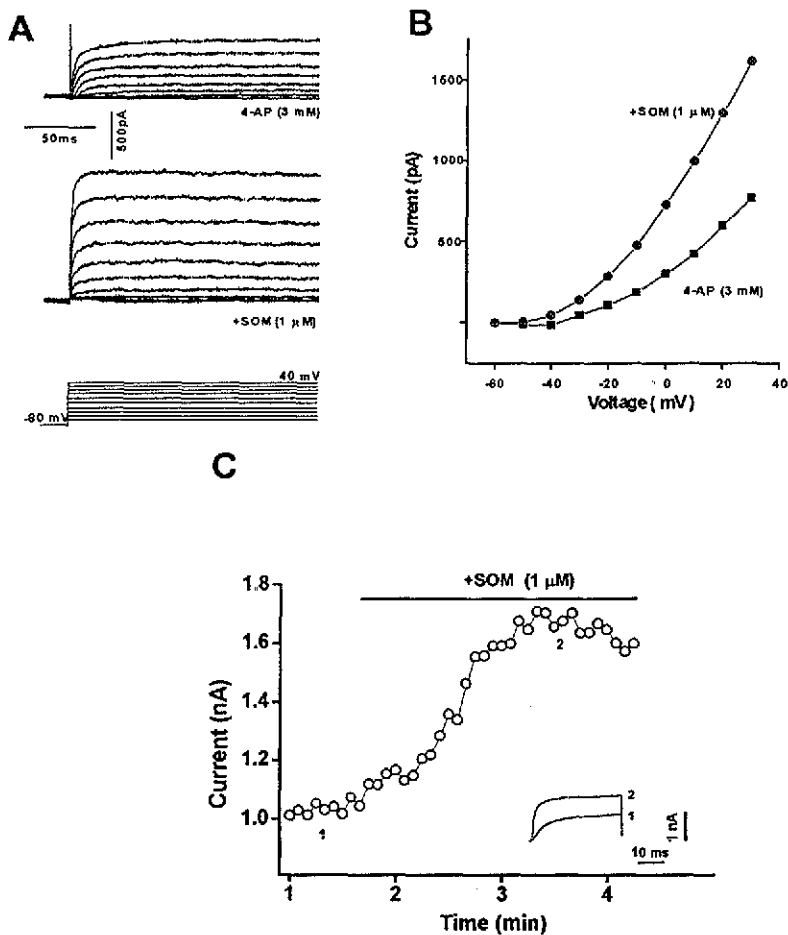


Fig. 10. Efecto de la SOM (1 μM) sobre la corriente saliente persistente en neuronas del neocortico. A. La SOM aumenta la I persistente de K⁺. B. Relación corriente-voltaje de I_K obtenida en los experimentos mostrados en A. C. Curso temporal del efecto de la SOM sobre la I_K

Debido a que en un alto porcentaje de la corriente saliente persistente en estas neuronas se debe a la activación de canales de potasio que dependen de calcio (Bargas et al 1999), se utilizaron los bloqueadores de éstos, con el objetivo de conocer si la SOM ejerce sus efectos modulatorios sobre algún canal en específico. En la figura 11A se muestra que en la presencia de 1 mM de TEA o en presencia de IbTx (toxina extraída del escorpión *Buthus tamulus*), a una concentración de 10 nM (datos no mostrados), ambos bloqueadores de los canales tipo BK ó maxi-K (Galvez et al. 1990), la aplicación de SOM-14 (1 μ M) provocó una disminución del 25 ± 2.5 % en la corriente insensible a estos bloqueadores (n=6). La relación corriente voltaje muestra la disminución en la corriente provocada por la SOM-14, sin embargo, cabe mencionar que esta se activa a voltajes más hiperpolarizados con respecto al control (fig 11B)

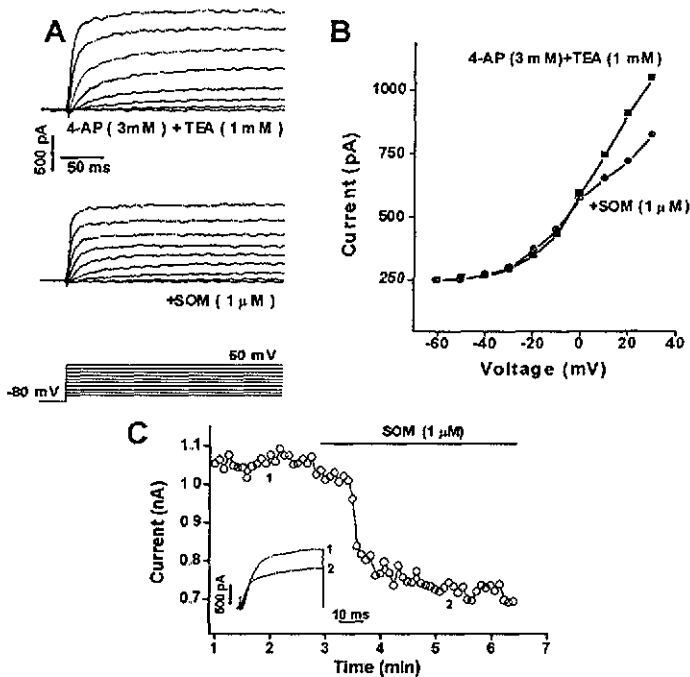


Fig. 11. La SOM inhibe los canales de potasio dependientes de calcio de conductancia pequeña (SK). A. En presencia de TEA 1 mM y 4-AP 3 mM, la SOM inhibe la corriente. B Relación corriente-voltaje construida a partir de los registros en A. C. Curso temporal del efecto de la SOM en presencia de 4-AP (3 mM) y TEA (1 mM).

De la misma manera se probó el efecto de este péptido sobre el PPH, en la presencia de TEA 1mM, el cual se ha demostrado que retrasa la repolarización del potencial de acción, bloquea la fase rápida y aumenta la fase lenta del PPH (Pineda et al. 1992), (fig 12A). Bajo estas condiciones la aplicación de 1 μ M de SOM-14 produjo una disminución significativa de la amplitud (medida al pico máximo) del componente lento del PPH, generado por un potencial de acción ($28.43 \pm 1.7 \%$) (n=4), (fig. 12A) Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos realizados con la técnica de fijación de voltaje.

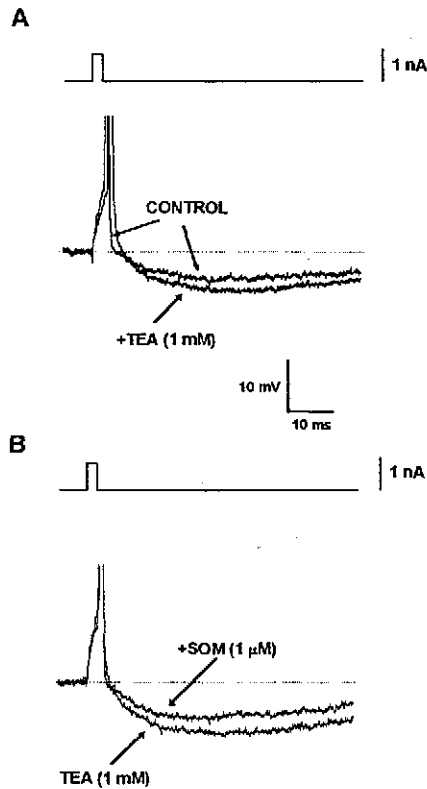


Fig. 12. La SOM reduce la fase lenta del PPH. A. El TEA (1 mM) retarda la repolarización del potencial de acción y aumenta el componente lento del PPH. B. La SOM (1 μ M) produce una reducción en la fase lenta del PPH.

Por otro lado, la presencia de 200 nM de apamina, bloqueador de los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia (SK), (Blatz y Magleby, 1986, Bourque y Brown 1987, Candia et al 1992, Sah 1996, Stocker et al 1999), produjo una reducción de alrededor del $25.4 \pm 4.6\%$ en la corriente persistente. Bajo estas condiciones la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de SOM-14, provocó un incremento en la corriente saliente del $55 \pm 9.5\%$ ($n=6$) (fig 13A). En la figura 13B se observa la relación corriente voltaje construida a partir de las corrientes en A, como se puede observar la corriente se activa a un umbral menor. El curso temporal del efecto de la apamina y de la SOM se observa en la figura 13C.

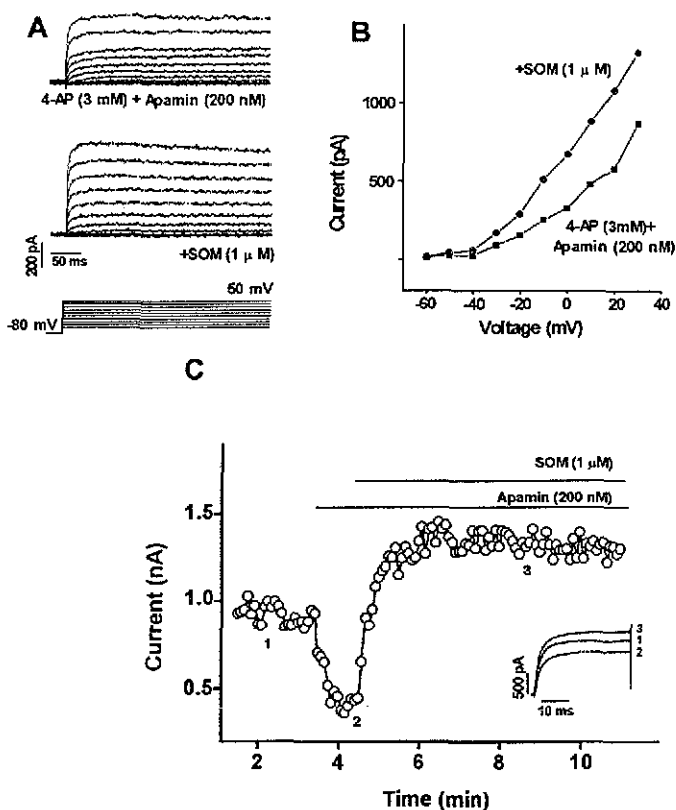


Fig. 13 La SOM aumenta los canales de potasio dependientes de calcio tipo BK. A. Las corrientes en presencia de 4-AP (3 mM) y Apamina (200 nM), son aumentadas por SOM. B Curva corriente-voltaje construida a partir de las corrientes en A. C. curso temporal del efecto de la apamina y la SOM.

Estudios previos indican que la fase lenta del PPH es bloqueado por la apamina, sin que la fase inicial se vea afectada (Pineda et al. 1992). El efecto de este péptido sobre el PPH generado por un pulso breve de corriente es mostrado en la figura 14A. Note que la apamina redujo tanto la amplitud al pico del PPH así como su duración. La reducción en el pico de la amplitud fue variable entre las células. Al adicionar al medio de perfusión SOM-14 (1 μ M) encontramos un aumento considerable en el componente rápido del PPH (25% \pm 2) (n=4), haciéndose más rápida la repolarización del potencial de acción, además puede observarse una oclusión del efecto de la SOM en la región bloqueada por apamina (fig 14B). Este aumento concuerda con el observado en las corrientes de potasio.

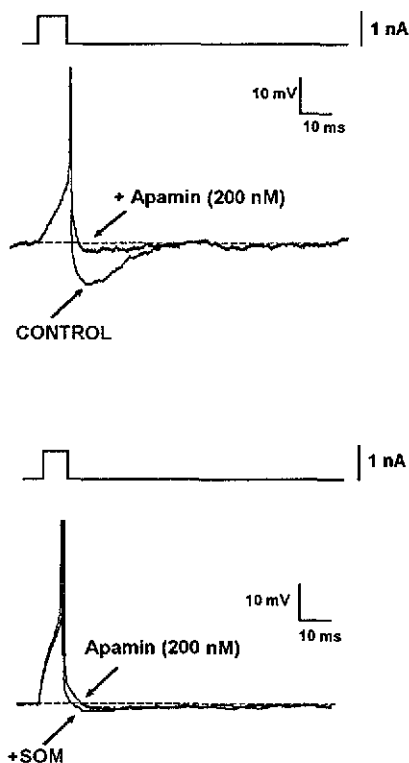


Fig. 14 Aumento de la repolarización del potencial de acción y de la fase rápida del PPH, provocada por la aplicación de 1 μ M de SOM-14 en neuronas espinosas medianas neocorticales. A La apamina (200 nM) reduce la fase lenta del PPH. B SOM-14 aumenta la fase rápida del PPH

El efecto dual de la SOM sobre las corrientes de potasio tiene un efecto complejo sobre las propiedades de disparo de las células, ya que al actuar diferencialmente sobre el PPH, el patrón de disparo se modificó en diferentes formas. En la figura 15A se muestra un tren de potenciales de acción provocado por pasos de corriente despolarizantes de 300 ms de duración en condiciones control. La posterior aplicación de SOM-14, a una concentración de 1 μM causó una disminución en la frecuencia de disparo después de 20 min (fig. 15B). Adicionalmente se pueden observar periodos cortos en los cuales la célula puede no disparar tónicamente o disparar en forma de ráfagas, después de un periodo de fallas (fig 15B)

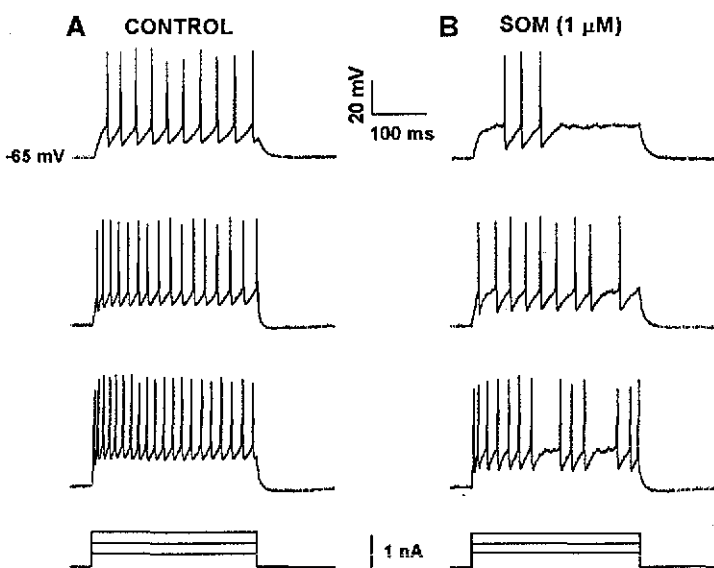


Fig. 15 Trens de potenciales de acción en neuronas espinosas medianas, provocados por pasos despolarizantes de corriente de 300 ms de duración. Con la aplicación de 1 μM de SOM-14 disminuye la frecuencia de disparo de la célula, además de que se puede observar un disparo en forma de ráfagas.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demuestran que la SOM regula el patrón y la frecuencia de disparo de las neuronas de proyección del neocórtex, a través de la modulación de las diferentes conductancias que participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante (PPH).

En estas neuronas el PPH, que sigue al potencial de acción, se caracteriza por presentar una fase rápida que dura unos cuantos milisegundos, generado por la activación de canales de potasio de alta conductancia (BK). Durante el potencial de acción estos canales se activan y repolarizan rápidamente la membrana, llevándola a potenciales más negativos que el potencial umbral. La fase lenta del postpotencial es generada por los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia (SK) (Pineda et al., 1992).

Nuestros resultados demuestran que la SOM modifica este PPH en una forma compleja, presentándose un efecto dual sobre las conductancias que lo generan, encontrándose un aumento en la repolarización del potencial de acción así como de la fase rápida y una disminución de la fase lenta del PPH (fig. 9A). Estos resultados producen un aumento en la frecuencia de disparo de las células (fig. 9B).

El aumento en la parte inicial del PPH puede atribuirse al incremento provocado por la SOM en las corrientes de potasio dependientes de calcio del tipo BK, mostradas en la fig. 10. Ya que el aumento observado es ocluido en la presencia de TEA (1 mM) o de IbTx (10 nM) (fig. 11 y 12) y es mayor en la presencia del bloqueador de los canales SK, apamina (fig. 13 y 14). Esto sugiere que dicho aumento es mediado por los canales de potasio dependientes de calcio tipo BK. Resultados similares han sido reportados en las células de tumores de la pituitaria (White et al. 1991, Duerson et al. 1996), y en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo de la rata (Schweitzer et al. 1993). Aunque nuestros resultados sugieren la modulación directa sobre estos canales, dado que hay una disminución en la corriente de calcio en estas células provocado por la SOM, no se descarta la posibilidad de que la SOM esté modulando otros canales de potasio, que participan en la generación de la corriente saliente persistente en estas células, como por ejemplo el rectificador retardado, el cual se ha reportado es modulado positivamente por este péptido en bastones de la retina (Akopian 2000, Akopian et al. 2000) y en las neuronas piramidales del núcleo cingulado anterior de la rata (Hicks et al. 1998). Por otro lado, en contraste a nuestros datos, se ha reportado una inhibición de los canales BK por la SOM en células secretoras de

insulina (Ribalet y Eddlestone, 1995) y en las neuronas bipolares de la retina (Petrucci et al. 2001). La diversidad de los efectos producidos por la SOM sobre los componentes de la corriente de potasio puede ser atribuida a los diferentes tipos de receptores que existen para la SOM y/o las vías de transducción de señales a las que estén acoplados los receptores. De hecho, en los oligodendrocitos de cerebro de rata la activación del receptor SSTR-1 inhibe al rectificador entrante (Karschin 1995), mientras que al incrementar la activación de los receptores SSTR-2 en los ovocitos de *Xenopus* incrementa esta misma conductancia (Kreienkamp et al. 1997)

La exposición a SOM también produce un cambio pequeño en la activación de las corrientes salientes en las neuronas espinosas medianas del estriado, sin embargo, dicho cambio podría ser atribuido a la disminución en las corrientes de calcio por SOM reportada en estas células (Vilchis et al 2002)

Por otro lado, la disminución de la fase lenta del PPH observada en condiciones control y en presencia de TEA (fig 9 y 12), puede explicarse por la inhibición de la corriente saliente provocada por la SOM en presencia de bloqueadores de canales BK (fig 11). Resultados que sugieren una modulación de la SOM sobre los canales de potasio activados por calcio tipo SK (fig 12) o bien una inhibición de la entrada de calcio que activa estos canales. La reducción parece ser selectiva para los canales SK ya que en presencia de apamina se ocluyó el efecto de la SOM sobre la fase lenta del PPH (fig. 14). Funcionalmente, la disminución de las corrientes a través de los canales SK provoca una reducción en la adaptación de la frecuencia de disparo, encontrándose así un incremento en la excitabilidad neuronal (fig 9B). Sin embargo, cuando se asocia a un aumento de la corriente debida a los canales BK, el disparo comienza a presentar fallas.

Los mecanismos por los que estos canales son modulados no se conocen, sin embargo, resultados previos indican que la SOM inhibe la entrada de calcio a las células modulando negativamente los canales de calcio voltaje dependientes en diferentes tipos celulares (Wang et al. 1990, Ayoub y Matthews 1992, Tallent et al. 1996, Traina et al 1996, Viana y Hille 1996, Glassmeier et al 1998, Traina y Bagnoli 1999, Akopian et al. 2000, Petrucci et al. 2001, Vilchis et al. 2001).

Tomados juntos estos hallazgos, sugieren que la modulación de los canales de potasio dependientes de calcio por SOM, pueden ser un resultado de la modulación de las corrientes de calcio. En efecto resultados previos en las neuronas de proyección neocorticales, han demostrado que los canales de potasio dependientes de calcio son selectivamente activados por el

influjo de calcio a través de canales de calcio voltaje dependientes tipo N, Q y R (Vilchis et al. 2000).

El acople funcional de los canales de calcio y de potasio que dependen de calcio puede ser parte de los mecanismos de modulación selectiva para la secreción del neurotransmisor.

No obstante, el aumento de la corriente BK por la SOM, no puede ser explicado directamente por la inhibición de la entrada de calcio a las células. El enlace funcional entre los canales BK y los canales de calcio tipo N, se ha reportado en varios tipos celulares (Viana et al., 1993, Wisgrida y Dryer 1994, Sah 1995). Los canales BK tienen baja afinidad por el calcio, son muy sensibles al voltaje y se requieren altas concentraciones del quelante BAPTA para bloquear su activación (McBurney y Neering, 1987), sugiriendo que estos canales se colocan (Robitaille 1993, Naragui y Neher, 1997). Lo anterior está de acuerdo con el papel funcional de los canales BK permitiendo que ellos se activen durante la fase de caída del potencial de acción para producir la repolarización de la membrana del soma y la generación del PPH (Pineda et al. 1992, Vilchis et al. 2000).

Adicionalmente, resultados previos en las células GH_4C_1 demuestran un aumento en la corriente de potasio por desfosforilación de los canales BK, mediada por la acción de la fosfatasa PP2A, mecanismo que involucra la activación de la PLA2 (White et al. 1991, Duerson et al. 1996). Resultados similares han sido reportados en las neuronas piramidales del hipocampo, donde la SOM estimula la activación de los canales BK a través de la acción de la 5-lipooxigenasa (Schweizer et al. 1993). Por lo tanto, la activación de los canales BK en las neuronas espinosas de proyección del neocórtex, a pesar de la disminución en la entrada de calcio, puede ser mediada por un efecto de la SOM sobre estos canales, que probablemente involucre alguna vía del ácido araquidónico (Duerson et al. 1996).

El PPH regula directamente la adaptación en la frecuencia de disparo de las neuronas del neocórtex, y es así un determinante principal de la excitabilidad neuronal (Rosenthal 1988, Galarraga et al. 1989, Pineda et al. 1992). Actualmente se conoce que la aplicación de un pulso de corriente supraumbrales en estas células, produce un disparo tónico, sin mostrar mucha adaptación en la frecuencia de disparo (Pineda et al. 1992). La adición de bloqueadores de canales de calcio de tipo no-L, así como de los de potasio activados por calcio, provocan un aumento en la frecuencia de disparo (Pineda et al. 1992). Los resultados obtenidos muestran que el PPH es modulado por la SOM (fig. 9), sin embargo, cabe enfatizar que dicha modulación es compleja y se

refleja con cambios en el patrón de disparo de estas neuronas, ya que en algunas células se encontró un aumento transitorio en la frecuencia de disparo (fig. 9), mientras que en la mayoría se encontró una disminución de dicha frecuencia y con un cambio en el patrón de disparo de una forma regular a otra irregular (fig. 15B)

Las células en las que se presentó el disparo irregular se caracterizaron por presentar oscilaciones de la membrana con disparos en forma de ráfaga seguida por periodos de fallas (fig 15B). La modulación diferencial de las conductancias que participan en la generación del PPH, pueden fundamentar la tendencia a las fallas de estas células en presencia de SOM (fig. 15B). El aumento de la corriente de potasio activada por calcio tipo BK (fig. 11) junto con la disminución en las conductancias de los canales tipo SK (fig. 11), puede contribuir directamente a la generación de ráfagas de alta frecuencia con periodos de silencio (fig. 15B)

Modulación de las corrientes de calcio por la SOM

En las neuronas de proyección del neocórtex, las corrientes de potasio activadas por calcio son preferencialmente activadas por calcio que entra a las células a través de canales de calcio voltaje dependientes, particularmente de los tipos N y los Q, ya que el bloqueo de estos canales con toxinas específicas reduce significativamente el PPH en estas células (Vilchis et al , 2000).

Por lo anterior decidimos estudiar la modulación de los canales de calcio por la SOM, encontrando que este péptido modula el potencial de calcio generado por la aplicación de altas concentraciones de TEA (20 mM), el cual bloquea la repolarización del potencial de acción produciendo un potencial de calcio (Kita et al. 1985, Galarraga et al 1989, Bargas et al 1989). La disminución en la duración del potencial de calcio observado debe ser el resultado de la modulación de los canales de calcio como en otros tipos neuronales (Ikeda et al. 1989, Wang et al. 1990, Scharfman 1993, Fujii et al. 1994, Meriney et al. 1994, Ishibashi et al. 1995, Tallent et al. 1996, Viana y Hille 1996, Bohelm y Betz 1997, White et al. 1997). El efecto de la SOM es directo ya que en presencia de TTX se siguió observando una disminución en la duración del potencial de calcio provocado por TEA.

Las corrientes de calcio en las neuronas de proyección se llevan a cabo a través de canales de calcio voltaje dependientes de los tipos N, P/Q, L y R (Bargas et al. 1994).

Los presentes resultados muestran que la SOM inhibe las corrientes de calcio en las

neuronas del neocórtex, en concordancia con los reportados en otros tipos neuronales (Wang et al. 1990, Tallent et al. 1996, Viana y Hille 1996, Boehm y Betz 1997). Encontramos que la SOM selectivamente inhibe los canales de tipo No-L, es decir, los canales N, P/Q y probablemente los R. Al igual que en las neuronas de la amígdala de la rata (Viana y Hille 1996) y en neuronas del hipocampo (Ishibashi y Akaike 1995), se encontró modulación por SOM de los canales sensibles a ω -CgTx GVIA y ω -Aga-IVA, antagonistas de los canales N y P/Q, respectivamente. Por otra parte, se ha reportado que la SOM reduce la corriente de calcio tipo L en varias preparaciones incluyendo a las células bipolares de la retina del pez dorado (Ayoub y Matthews 1992) y los fotorreceptores de la retina de la salamandra (Akopian et al. 2000). Interesantemente, la SOM reduce la corriente de calcio L en bastones pero la incrementa en conos (Akopian et al. 2000). En contraste a estos resultados nuestros datos muestran que la SOM no tiene ningún efecto sobre los canales de tipo L en neuronas del neocórtex (Vilchis et al. 2001).

La reducción de la corriente de calcio N y P/Q, por la SOM, en las neuronas espinosas medianas puede explicar la inhibición de la fase lenta del PPH encontrada en nuestras células (fig 8A). Como se ha mencionado con anterioridad, esta fase se debe a la activación de canales de potasio activados por calcio SK, los cuales presentan una alta sensibilidad al calcio, son insensibles al voltaje y presentan una conductancia unitaria pequeña de alrededor de 5-20 pS (Lancaster et al. 1991). Dado que la activación de estos canales requiere de la entrada de calcio extracelular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, específicamente los N y los P/Q (Vilchis et al. 2000), se sugiere que la SOM pudiera estar ejerciendo sus efectos sobre los canales SK de manera indirecta a través de la inhibición de los de calcio.

Las múltiples acciones de la SOM, pueden ser mediadas a través de la activación de 5 tipos de receptores acoplados a proteínas G; sin embargo, debido a la inexistencia de agonistas y antagonistas específicos no se determinó el tipo de receptor que media estas respuestas, aunque no se descarta la posibilidad de que sean varios tipos los que están regulando las conductancias que participan en el disparo de las neuronas espinosas medianas. No obstante, los resultados encontrados se deben a la activación de los receptores a SOM ya que en presencia del antagonista de los receptores a SOM el CPP-1, no se encontró ninguna respuesta. Estudios posteriores se requieren para conocer cuál o cuales receptores así como los mecanismos celulares, que están involucrados en la regulación de las propiedades de disparo de estas neuronas.

Adicionalmente, cabe mencionar que aunque se ha reportado que los receptores a SOM se

desensibilizan (Hipkin et al 1997), nosotros no observamos esta respuesta ante la aplicación del péptido.

Los resultados en conjunto demuestran que las neuronas de proyección del neostriado son blanco de modulación por la SOM, la cual es sintetizada y liberada por interneuronas somatostatinérgicas

Implicaciones Funcionales

En los ganglios basales el mayor número de neuronas que contienen SOM se encuentran en el neostriado. Son las interneuronas somatostatinérgicas que comprenden el 1% de la población celular de este núcleo y que además son GABAérgicas (Kawaguchi et al. 1995). La coexistencia de la SOM con el GABA, puntualiza un papel de la SOM como un co-transmisor del GABA en un circuito local.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la SOM puede actuar como un neuromodulador regulando la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas, a través de la modulación de diferentes conductancias que participan en la generación del mismo. Los cambios observados en las propiedades del disparo de estas células, pueden resultar en modificaciones de la liberación del neurotransmisor. De hecho, en experimentos de superfusión se ha mostrado, que la SOM-14 inhibe o aumenta la liberación de GABA-³H en el estriado de la rata, de una forma dosis dependiente. Parece ser que los efectos inhibitorios ocurren a nivel presináptico, mientras que el aumento se debe a una acción postsináptica (Meyer et al. 1989). Adicionalmente, los datos sugieren que las interneuronas somatostatinérgicas pueden actuar produciendo una inhibición retroalimentadora en el neostriado.

Por otro lado, diversas evidencias clínicas y de comportamiento indican una interacción entre los sistemas somatostatinérgicos y dopaminérgicos, sugiriendo que la SOM está involucrada en la modulación del control motor mediado por dopamina (DA). Se ha reportado que la SOM aumenta la liberación de la DA en el estriado de la rata (Chesselet y Reisine 1983). Además se ha encontrado que la activación de los receptores D1 y D2 a DA, incrementan la actividad del sistema receptor-efector somatostatinérgico en la corteza frontoparietal de la rata (Izquierdo-Claros et al 2000). Resultados que sugieren que la SOM puede regular de manera indirecta las respuestas mediadas por la dopamina. Por último, recientemente se ha reportado la colocalización de los receptores de SOM y DA en subgrupos neuronales, adicionalmente se ha

demostrado que ambos receptores pueden formar hetero-oligómeros, para crear un nuevo receptor con actividad funcional propia en neuronas del neostriado (Rocheville et al 2000)

Por último las implicaciones funcionales de la modulación de las diferentes conductancias iónicas por la SOM, deben ser consideradas para la síntesis de fármacos necesarios para el tratamiento de enfermedades motoras tales como la corea de Huntington y el mal del Parkinson

CONCLUSIONES

- * La SOM inhibe las corrientes de calcio, a través de la modulación de los canales tipo P/Q, los N y probablemente los R.
- * La SOM modula diferencialmente las corrientes de potasio dependientes de calcio, activa a los canales BK e inhibe a los canales SK
- * Los cambios en las conductancias de potasio producen un aumento en el PPH rápido y una disminución en el PPH lento
- * El efecto de la SOM sobre las corrientes de potasio y calcio se refleja en una respuesta compleja en la frecuencia y el patrón de disparo de las neuronas, ya que en algunos casos se observó un aumento en la frecuencia, mientras que en otras se produjo un disparo irregular.
- * La SOM ejerce acciones complejas sobre las neuronas de proyección a través de la activación de sus receptores, por lo que se espera que los análogos de éste péptido tengan efectos profundos sobre las funciones motoras controladas por los ganglios basales.

BIBLIOGRAFÍA

Adelman J. P., Shen K-Z, Kavanaugh M. P., Warren R. A., Wu Y-N., Lagruta A., Bond C. T., North R. A. (1992) Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary cDNAs *Neuron* 9:209-216.

Akopian A. (2000) Neuromodulation of ligand- and voltage-gated channels in the amphibian retina. *Micros Res Tech* 50: 403-410

Akopian A., Johnson J., Gabriel R., Brecha N., Witkovsky P. (2000) Somatostatin modulates voltage-gated K^+ and Ca^{2+} currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J. Neuroscience* 20 (3): 929-936

Arbib M. P., Erdi J., Szentágothai (1998) Basal Ganglia en: Neural Organization, structure function and dynamics MIT Press. Cambridge cap 10:303-328.

Armstrong D. L. (1995) Environmental toxins reveal ion channel regulation by protein phosphatases *Neuroprotocols* 6:62-71

Ayoub G. S., Matthews G. (1992) Substance P modulates calcium current in the retinal bipolar neurons *Vis. Neurosci.* 8:539-544.

Bargas J., Galarraga E., Aceves J. (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons in the rat brain *Exp. Brain Res.* 75: 164-156

Bargas J., Howe A., Eberwine J., Cao Y., Surmier J. (1994) Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14: 6667-6686

Bargas J., Ayala G. X., Vilchis C., Pineda J. C., Galarraga E. (1999) Ca^{2+} -activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88:(2): 479-488.

Bean B. P. (1989) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51:367-384.

Bell G. I., Reisine T. (1993) Molecular biology of somatostatin receptors *TINS* 16 34-38

Blatz A. L., Magleby K. L. (1986). Single apamin-blocked Ca -activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323:718-720.

Boehm S., Betz H. (1997) Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J. Neurosci.* 17: 4066-4075

Bolam J. P., Wainer B. H., Smith A. D. (1984) Characterization of cholinergic neurons in the rat striatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi impregnation and electron microscopy *Neuroscience* 12: 711-718

Bourque C W., Brown D.A (1987) Apamin and D-tubocurarine block the afterhyperpolarization of rat supraoptic neurosecretory neurons. **Neurosci Lett** 82:185-190

Brakch N., Rholam M., Boussetta H., Cohen P. (1993) Role of beta-turn in proteolytic processing of peptide-hormone precursors at dibasic sites **Biochemistry** 432: 4925-4930

Brakch N., Galanopoulou A S., Patel Y S., Boileau G., Seidah N. G. (1995). Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, Furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways **FEBS Lett.** 362:143-146

Brazeau P, Vale W.; Burgus R, Ling N, Rivier J y Guillemin R (1972) Hypothalamic polipeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone **Science** 129:77-79

Brown D. A. (1990) G-proteins and potassium currents in neurons **Ann. Rev. Physiol** 52:215-242.

Bruno J. F, Xu Y, Berelowitz M (1994). Somatostatin regulates somatostatin receptor subtype mRNA expression in GH₃ cell. **Biochem. Biophys. Res Commun** 202.1738-1743.

Buscail L., Delesque N., Esteve J-P, Saint-Laurent N., Prats H., Clerc P., Robeberecht P., Bell G. I., Liebow C, Schally A V, Vaysse N, Susini C. (1994) Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: Mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:2315-2319.

Buscail L, Esteve J-P., Saint-Laurent N., Bertrand V., Reisine T, O'Carroll A M., Bell G. I., Schally A V, Vaysse N, Susini C. (1995) Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:1580-1584.

Candia S, Garcia M.L., Latorre R (1992) Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. **Biophys J.** 63:583-590.

Carbone W, Lux H. D. (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurons **Nature** 310:501-502.

Catterall W A (1995), Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu. Rev. Biochem.** 65; 493-531.

Catterall W A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels **Annu. Rev. Cell Dev. Biol** 16:521-555

Chesselet M. and Reisine D (1983) Somatostatin regulates dopamine release in rat striatal slices and cat caudate nuclei. **J. Neuroscience** 3:(1):232-236

Christian E. P., Togo J, Naper K. E. (1994). Guinea pig visceral C-fiber neurons are diverse with respect to the K⁺ currents involved in action-potential repolarization. **J. Neurophysiol** 71:2 561-74

Cowan R. L., Wilson C. J., Emson P. C., Heizmann C.W. (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum **J. Comp. Neurol.** 302:197-205.

Cox D. H., Cui J., Aldrich R. W. (1997) Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K⁺ channel **J. Gen. Physiol.** 110:257-281

Dahms P., Mentlein R. (1992) Purification of the main somatostatin-degrading proteases from rat and pig brains, their actions on others neuropeptides and their identification as endopeptidases 24.25 and 24.16. **Eur. J. Biochem.** 208:145-154

Davies P. J., Irelan D. R., McLachlan E. M. (1996) Sources of Ca²⁺ for different Ca²⁺-activated K⁺ conductances in neurons of the rat superior cervical ganglion. **J. Physiol.** 495:353-366

Dawson T. M., Bredt D. S., Fotuhi M., Hwang P. M., Snyder S. H. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88 7797-7801.

De Jongh K. S., Warner C., Catterall W. A. (1990) Subunits of purified calcium channels $\alpha 2$ y δ are encoded by the same gene. **J. Biol Chem.** 265: 14738-14741

De Weille J. R., Schmid-Antomarchi H., Fosset M., Lazdunski M. (1989) Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells: Activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:2971-2975.

DiFligia M., Pasik P., Pasik T. (1976) A golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys **Brain Res.** 114: 245-256

Dournaud P., Gu Y. Z., H., Schonbrunn A., Mazella J., Tannenbaum G. S., Beaudet A. (1996) Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific antipeptide antibody. **J. Neuroscience** 16:4468-4478.

Dournaud P., Boudin H., Schonbrunn A., Tannenbaum G. S., Beaudet A. (1998) Interrelationships between somatostatin SST2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain. Evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin **J. Neuroscience** 18: 1056-1071.

Dryer S. E., Dourado M. M., Wisgirda M. E. (1991). Properties of Ca²⁺ currents in acutely dissociated neurons of the chick ciliary ganglion: inhibition by somatostatin-14 and somatostatin-28 **Neuroscience** 44:663-672.

Duerson K., White R. E., Jiang F., Schonbrunn A., Armstrong, D. L. (1996) Somatostatin stimulates BKCa channels in rat pituitary tumor cells through lipoxigenase metabolites of arachidonic acid **Neuropharmacology** 35:(7):949-961.

Ellis S. B., Williams M. E., Ways N. R., Brenner R., Sharp A. H. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the $\alpha 1$ and $\alpha 2\delta$ subunits of a DHP-sensitive calcium channels. **Science** 241:1661-1664

Epelbaum J. (1986) Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. **Prog. Neurobiol.** 27:63-100

Epelbaum J., Dournaud P., Fodor M., Viollet C. (1994) The neurobiology of somatostatin. **Crit. Rev. Neurobiol.** 8:25-44

Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Pérez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W., Catterall W. A. (2000) **Neuron** 25:533-535

Fisher R. S., Buchwald N. A., Hull C. D., Levine M. S. (1986) The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling. **Brain Res.** 398:148-56

Flores-Hernández J., Galarraga E., Pineda J. C., Vargas J. (1994) Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. **J. Neurophysiol.** 72(5):2246-2256

Florio T., Rim C., Hershberger R. E., Loda M., Storck P. J. (1994) The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. **Mol. Endocrinology.** 8:1289-1297.

Florio T., Scarziello A., Fattore M., Dalto V., Salzano S., Rossi G., Berlingieri M. T., Fusco A., Schettini G. (1996) Somatostatin inhibits PC C13 thyroid cell proliferation through the modulation of phosphotyrosine phosphatase activity-impairment of the somatostatinergic effects by stable expression of E1A viral oncogene. **J. Biol. Chem.** 271:6129-6136.

Fujii Y., Gonoi T., Yamada Y., Chihara K., Inagaki N., Seino S. (1994) Somatostatin receptor subtype SSTR2 mediates the inhibition of high voltage activated calcium channels by somatostatin and its analogue SMS201-995. **FEBS Lett.** 355:117-120.

Galarraga E., Vargas J., Aceves J. (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. **Exp. Brain Res.** 75:157-168.

Galvez A., Gimenez-Gallego G., Reuben J. P., Roy-Contancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G. J., García M. L. (1990) Purification and characterization of unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **J. Biol Chem** 265:11083-11090.

García Calvo M., Knaus H. G., McManus O. B., Giangiacomo K. M., Kaczorowski G. J., García M. L., Knaus H. G. (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. **J. Biol. Chem.** 269:676-682

Gerfen C. R. (1989) The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. **Science** 246:385-388

Gerfen C. R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental distribution of calcium binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82:8780-8784.

Glassmeier G., Hopfner M., Riecken E. O., Mann B., Buhr H., Neuhaus P., Wiedenmann B., Scherubl H. (1998) Inhibition of L-type calcium channels by somatostatins in human neuroendocrine tumor cells of the gut **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 17 859: 208-9

Goodman R., Jacobs J., Chin W., Lund P., Dee P., Habner J. (1980) Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of pancreatic somatostatin **Proc. Natl. Acad. Sci.** 77:5869-5873

Goodman R. H., Aron D. C., Ross B. A. (1983) Rat pre-prosomatostatin: structure and processing by microsomal membranes. **J. Biol. Chem.** 258:5570-5573.

Göther M. (1980) Somatostatin selectively inhibits noradrenaline release from hypothalamic neurones. **Nature** 288:86-88.

Graybiel A. M. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia **TINS** 13:244-254.

Greenwood M. T., Hukovic N., Kumar U., Panetta R., Hjorth S. A., Srikant C. B., Patel Y. C. (1997). Ligand binding pocket of the human somatostatin receptor 5 (hsstr5): Mutational analysis of the extracellular domains. **Mol. Pharmacol.** 52:807-814

Gu Y. Z., Schonbrunn A. (1997) Coupling specificity between somatostatin receptor sst2A and G proteins: Isolation of the receptor-G protein complex with a receptor antibody. **Mol. Endocrinology** 11(5): 527-537

Gurnett C. A., De Waard M., Campbell K. P. (1996). Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha 2\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. **Neuron** 16: 431-440.

Hanner M., Schmalhofer W. A., Munujos P., Knaus H. G., Kaczorowski G. J., Garcia M. L. (1997). The β subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor of charibdotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94 2853-2858.

Harrington K. A., Schindler M., Humprey P. P. A., Emson P. C. (1995) Expression of messenger RNA for somatostatin receptor subtype 4 in adult rat brain. **Neuroscience Letters** 188 17-20.

Heginbotham L., Lu Z., Abramson T., Takai T., Mackinnon R. (1994) Mutation in the K^{+} channel signature sequence **Biophys J.** 66:1061-1067.

Hervieu G., Emson P. C. (1998) The localization of somatostatin receptor 1 (sst1) immunoreactivity in the rat brain using an N-terminal specific antibody **Neuroscience** 85:1263-1284

Hicks G. A., Feniuk W., Humphrey P. P. (1998) Outward current produced by somatostatin (SRIF) in rat anterior cingulate pyramidal cells in vitro **Br. J. Pharmacol** 124:252-258.

Hille B. (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. **Trends Neurosci.** 17:531-536.

Hipkin R. W., Friedman J., Clark R. B., Eppler C. M., Schonbrunn A. (1997) Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor. **J. Biol. Chem.** 272:(21):13869-76

Hoffman F., Biel M., Flockerzi V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. **Annu. Rev. Neurosci.** 17: 399-418.

Hoyer D., Lübbert H., Bruns C. (1994) Molecular pharmacology of somatostatin receptors **Naunyn Schimiedeberg's Arch. Pharmacol.** 350:441-453

Hoyer D., Bell G. I., Berelowitz M., Epelbaum J., Feniuk W., Humphrey PPA, O'Carroll A. M., Patel Y. C., Schonbrunn A., Taylor J. E., Reisine T. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors **TIPS** 16:86-88

Ikeda S. R., Schofield G. G. (1989) Somatostatin blocks a calcium current in rat sympathetic ganglion neurons **J. Physiol. (Lond)** 409:221-240

Ikeda S. R., Dunlap K. (1999) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res** 33:131-151

Ishii T. M., Silvia C., Hirschberg B., Bond C. T., Adelman J. P., Maylie J. (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:11651-11656.

Ishibashi H., Akaike N. (1995) Somatostatin modulates high-voltage-activated Ca²⁺ channels in freshly dissociated rat hippocampal neurons **J. Neurophysiol.** 74: 1028-1036

Izquierdo-Claros R. M., Boyano-Adán M. C., Arilla-Ferreiro E. (2000) Activation of D1 and D2 dopamine receptors increases the activity of the somatostatin receptor-effector system in the rat frontoparietal cortex. **J. Neuroscience Research** 62:91-98

Jan L. Y., Jan Y. N. (1989) Voltage-sensitive ion channels **Cell** 56:13-25

Jan L. Y., Jan Y. N. (1997) Cloned potassium channels from eucaryotes and procaryotes. **Annu Rev. Neurosci.** 20:91-123

Jay S. D., Ellis S. B., McCue A. F., Williams M. E., Vedvick T. S. (1990) Primary structure of gamma subunit of DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle **Science** 248: 490-492

Jay S. D., Sharp A. H., Kahl S. D., Vedvick T. S., Harpold M. M. (1991) Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α_2 -subunit and the associated δ peptides. **J. Biol. Chem.** 266: 3287-3293.

Jiang Z-G, North R. A. (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat neostriatal neurons in vitro. **J. Physiol.** 443: 533-553

Joiner W. J., Wang L. Y., Tang M. D., Kaczmarek L. K. (1997). The hSK4: a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 11013-11018

Jones S. W., Elmslie K. S. (1997) Transmitter modulation of neuronal calcium channels. **J. Membr Biol** 155:1-10.

Kawaguchi Y. (1992) Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. **J. Neurophysiol.** 69:416-431.

Kawaguchi Y., Kubota Y. (1995) Local circuit neurons in the frontal cortex and the neostriatum. In Kimura M., Graybiel A. M. (Ed.) *Functions of the Cortico-Basal Ganglia Loop* 73-88.

Karschin A. (1995) Molecular single-cell analysis identifies somatostatin type 1 (sst1) receptors to block inwardly rectifying K⁺ channels in rat brain oligodendrocytes. **Neuroreport** 7:121-124

Kaupmann K., Bruns C., Raulf F., Weber H. P., Mattes H., Lubbert H. (1995). Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. **EMBO J.** 14:727-735.

Kita H., Kita T., Kitai S. T. (1985) Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. **Exp. Brain Res.** 60(1):54-62

Kita H., Kosaka T., Heizmann C. W. (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. **Brain Res.** 536:1-15.

Klugbauer N., Lacinová L., Marais E., Hobbom M., Hofmann F. (1999) Molecular diversity of the calcium channel $\alpha_2\delta$ subunit. **J. Neurosci.** 19: (2): 684-691.

Köhler M., Hirschberg B., Bond C. T., Kinzie J. M., Marrion N. V., Maylie J., Adelman J. P. (1996) Small conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. **Science** 273: 1709-1714.

Kong H., DePaoli A. M., Breder C. D., Yasuda K., Bell G. I., Reisine T. (1994) Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in adult rat brain: Analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry. **Neuroscience** 59(1): 175-184.

Kreienkamp H. J., Honck H. H., Richter D. (1997) Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK 1) **FEBS Lett.** 419: 92-94.

Kumar U., Patel S C., Patel Y.C (1996) Immunohistochemical distribution of the five somatostatin receptor (SSTR) subtypes in rat cerebral cortex. Program Annual Meeting Society for Neuroscience.

Kumar U., Ong W-Y., Patel S. C., Patel Y.C. (1999) Cellular expression of the five somatostatin receptor (SSTR1-5) subtypes in rat hypothalamus: A comparative immunohistochemical analysis Program Annual Meeting US Endocrine Society, San Diego CA.

Lancaster B., Nicholl R. A. (1987). Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. **J. Physiol. Lond.** 389:187-203.

Lancaster B., Nicholl R. A., Perkel D. J. (1991) Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. **J. Neuroscience** 11:23-30.

Latorre R., Oberhauser A., Labarca P., Alvarez O. (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annu Rev. Physiol.** 51: 385-399.

Letts V. A., Felix R., Biddlecome G. H., Arikath J., Mahaffey C. L. (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺ channel γ subunit. **Nat. Genet.** 19: 340-347

Llinas R, Sugimori M, Lin J. W., Cherksey B. (1989) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 86:5 1689-93

Luthin D. R., Eppler C. M., Linden J. (1993) Identification and quantification of Gi-type GTP-binding proteins that copurify with a pituitary somatostatin receptor. **J. Biol. Chem** 268:5990-5996.

Mandarino L., Stenner D., Blanchard W., Nissen S., Gerich J., Ling N., Brazeau P., Bohlen P., Esch F., Guillemin R (1981). Selective effects of somatostatin-14,-25 and -28, on in vitro insulin and glucagon secretion. **Nature** 291:76-77.

Marin P., Delumeau J C., Tence M., Cordier J., Glowinski J., Premont J. (1991) Somatostatin potentiates the α 1-adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88:9016-9020.

McBurney R. N., Neering I. R. (1987) Neuronal calcium homeostasis. **Trends Neurosci.** 10:164-169.

McCleskey E. W., Fox A. P., Feldman D. H., Cruz L. J., Olivera B. M. (1987) ω -Conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84:4327-4331

McManus O. B., Helms L. M., Pallank M., Ganetzky B., Swanson R., Leonard R. J. (1995). Functional role of the beta subunit of high conductance calcium activated potassium channels. **Neuron** 14: 645-650

Meera P., Wallner M., Song M., Toro L. (1997) Large conductance voltage- and dependent ion channels with seven N terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus and an intracellular (S9-S10) C terminus **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 14066-14071

Meriney S. D., Gray D. B., Pilar G. R. (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current modulated by cGMP-dependent protein kinase **Nature** 369:336-339

Meves H. (1994) Modulation of ionic channels by arachidonic acid **Physiol Rev.** 70:513-562.

Meyer D., Conzelmann U., Schultheiss K. (1989) Effects of somatostatin on the *in vitro* release of H^3 -GABA from slices of rat caudate-putamen **Neuroscience** 28:61-68

Mintz I. M., Adams M. E., Bean B. P. (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. **Neuron** 9:85-95

Murthy K. S., Coy D. H., Mackhlouf G. (1996). Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. **J. Biol. Chem.** 271:23458-23463.

Naragui M., Neher E. (1997) Linearized buffered Ca^{2+} in microdomains and its implications for calculation of $[Ca^{2+}]_i$ at the mouth of a calcium channel **J. Neurosci.** 17: 6961-6973

Nowycky M. C., Fox A. P., Tsien R. W. (1985) Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity **Nature** 316:440-443

Park M. R., Lighthall J. W., Kitai S. T. (1980). Recurrent inhibition in the rat neostriatum. **Brain Res.** 194:359-369.

Patel Y. C. (1992) General aspects of the biology and function of somatostatin. In: Weil C., Muller E. E., Thorner M. O., Eds. **Basic and Clinical Aspects of Neuroscience** Berlin Springer-Verlag Vol 4, 1-16

Patel Y. C., Greenwood M. T., Kent G., Panetta R., Srikant C. B. (1993) Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2. Tissue selective distribution and cAMP regulation **Biochem Biophys Res Commun.** 192: 288-294.

Patel Y. C., Greenwood M. T., Panetta R., Demchyshyn L., Niznik H., Srikant C. B. (1995) The somatostatin receptor family: A mini review. **Life Sci.** 57:1249-1265

Patel Y. C. (1997) Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. **J. Endocrinol Invest.** 20:348-367.

Patel Y. C. (1999) Somatostatin and its receptor family **Frontiers in Neuroendocrinology** 20:157-198.

Pérez J, Hoyer D (1995) Coexpression of somatostatin SSTR-4 y SSTR-3 receptor mRNAs in the rat brain. **Neuroscience** 64:241-253

Pérez-Reyes E., Schneider T. (1995). Molecular biology of calcium channels **Kidney Int.** 48:1111-1124.

Pérez-Reyes E, Cribbs L. L, Daud A, Lacerda A E, Barclay J. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. **Nature** 391: 896-900

Petrucci C., Resta V, Fieni F, Bigiani A, Bagnoli P (2001) Modulation of potassium current and calcium influx by somatostatin in rod bipolar cells isolated from the rabbit retina via sst2 receptors **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol** 363: 680-694.

Phelps P. E., Houser C. R., Vaughn J. E. (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. **J. Comp. Neurol.** 238:286-307.

Pineda J C., Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterpolarization in neostriatal neurons **J. Neurophysiol.** 68:287-294.

Piomelli D y Greengard P (1990) Lipoxigenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signaling **TIPS** 11:367-373.

Randall A., Tsien R W (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. **J. Neurosci.** 15:2995-3012.

Randall A., Benham C. D (1999). Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Mol Cell Neurosci** 14:(4-5):255-72

Raynor K., Reisine T. (1992). Somatostatin receptors. **Crit. Rev. Neurobiol.** 16:273-289

Reardon D B., Dent P, Wood S L., Kong T, Sturgill T. W. (1997). Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3 or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3t3 cells: Coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. **Mol. Endocrinol.** 11:1062-1069

Reichlin S. (1983) SRIF **New England J. Med.** 309:1495-1563.

Reinhart P. H., Levitan I. B (1995) Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. **J. Neurosci.** 15: 4572-4579

- Reisine T. (1995). Somatostatin **Cellular and Molecular Neurobiology**. 15.(6):597-614.
- Reubi J. C., Perrin M. H., Rivier J. E., Vale W. (1981) High affinity binding sites for a somatostatin-28 analog in rat brain **Life Sci.** 28:(19):2191-2198.
- Reuter H. (1983) Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs **Nature** 297:501-504
- Ribak C. E., Vaughn J. E., Roberts E. (1979). The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. **J Comp Neurol.** 187:2 261-83
- Ribalet B., Eddlestone G. T. (1995). Characterization of the G protein coupling of SRIF and beta-adrenergic receptors to the maxi K_{Ca} channel in insulin-secreting cells. **J. Membr. Biol.** 148: 111-125.
- Robitaille R., Garcia M. L., Kackzorowski G. J., Charlton M. P. (1993) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release **Neuron** 11 645-655.
- Rocheville M., (2000) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo and heterodimers. **J. Biol. Chem.** 275:(11): 7862-7869.
- Rocheville M., Lange D., Kumar U., Patel S., Patel R., Patel Y. (2000) Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers with enhanced functional activity **Science** 288:(5463):154-157.
- Rosenthal W., Hescheler J., Klaus-Dieter H., Spicher K., Trautwein W, Schultz G. (1988) Cyclic AMP-independent, dual regulation of voltage-dependent Ca^{2+} currents by LHRH and somatostatin in pituitary cell line. **EMBO J.** 1627-1633
- Sah P., McLachlan E. M. (1991) Ca^{2+} activated K^+ currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca^{2+} activated release. **Neuron** 7: 257-264.
- Sah P. (1992) Role of calcium influx and buffering in the kinetics of $Ca(2+)$ -activated K^+ current in rat vagal motoneurons. **J Neurophysiol.** 1992 68:(6):2237-2247
- Sah P. (1995) Different calcium channels are coupled to potassium channels with distinct physiological roles in vagal neurons, **Proc. R. Soc. Lond.** 260:105-111.
- Sah P. (1996) Ca^{2+} -activated K^+ currents in neurones types, physiological roles and modulation **Trends Neurosci.** 19:150-154.
- Saoh D. W. Y. (1993) Neurotransmitter modulation of calcium current in rat spinal cord neurons **J. Neuroscience** 10:136-141.

Scharfman H E (1993) Presynaptic and postsynaptic actions of somatostatin in area CA1 and dentate gyrus of rat and rabbit hippocampal slices. En: Presynaptic receptors in the mammalian brain Dunwiddie T. V., Lovinger D. M. Eds. Birkhäuser Boston

Schindler M., Humphrey P., Emson P. C. (1996) Somatostatin receptors in the central nervous system. **Progress in Neurobiol.** 50:9-47

Schweitzer P., Madamba S., Champagnat J., Siggins G. R. (1993) Somatostatin inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons: Mediation by arachidonic acid and its metabolites. **J. Neuroscience** 13:2033-2049

Schreiber M., Salkoff L. (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. **Biophys J.** 73:1355-1363

Seidah N. G., Gaspar L., Mion P., Marcinkiewicz M., Mbikay M., Chretien (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. **DNA** 9:415-424.

Seidah N. G. (1993) The mammalian prohormone convertases. **J. Neurochem.** 61:53

Sodickson D. L., Bean B. P. (1998) Neurotransmitter activation of inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons: Interactions among multiple receptors. **J. Neuroscience** 18:(20):8153-8162.

Srikant C. B. y Patel Y. C. (1981) Somatostatin receptors: Identification and characterization in rat brain membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:3930-3934.

Stanley E. F., Mirotznik R. R. (1997) Cleavage of syntaxin prevents G-protein regulation of presynaptic calcium channels. **Nature** 385: 340-343

Stocker M., Krause M., Pedarzani P. (1999) An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:(8):4662-4667.

Stotz S. y Zamponi G. W. (2001) Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca²⁺ channels. **Trends in Neuroscience** 24(3):176-181

Surmeier D. J., Xu Z. C., Wilson C. J., Stefani A., Kitai S. T. (1992). Grafted neostriatal neurons express a late-developing transient potassium current. **Neuroscience** 48:(4):849-56

Swartz K. J. (1993) Modulation of Ca²⁺ channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. **Neuron** 11:305-320.

Tallent M., Reisine T. (1992) G_{in1} selectively couples SRIF receptor to adenylyl cyclase in the pituitary cell line AtT-20. **Molec. Pharmacol.** 41 452-455

Tallent M., Liapakis G., O'Carroll A. M., Lolait S. J., Dichter M., Reisine T. (1996). Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca²⁺ current in the pituitary cell line AtT-20 **Neuroscience** 71 (4):1073-1081

Tanabe T., Mikami A., Niidome T., Numa S., Adams B. A., Beam K. G. (1993). Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle. **Ann N. Y. Acad Sci.** 707: 81-86

Tanaka S., Tsujimoto A. (1981) Somatostatin facilitates the serotonin release from rat cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus slices **Brain Res.** 208:219-232

Tanaka Y., Meera P., Song M., Knaus H. G., Toro L. (1997) Molecular constituents of maxi K_{Ca2+} channels in human coronary smooth muscle: predominant $\alpha+\beta$ subunit complexes **J. Physiol.** 502:545-557

Tseng-crank J., Foster C. D., Krause J. D., Mertz R., Godinot R., DiChiara T. J., Reinhart P. H. (1994) Cloning, expression and distribution of functionally distinct Ca²⁺-activated K⁺ channel isoforms from human brain **Neuron** 13:1315-1330

Thoss V. S., Pérez J., Probat A., Hoyer D. (1996) Expression of five somatostatin receptor mRNA in the human brain and pituitary. **Arch. Pharmacol.** 354:411-419

Toro L., Wallner M., Meera P., Tanaka Y. (1998) Maxi K_{Ca2+} a unique member of the voltage-gated K channel superfamily **News Physiol. Sci.**

Tottene A., Moretti A., Pietrobon D. (1996) Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. **J. Neurosci.** 16:6353-6363.

Traina G., Bagnoli P. (1999). Mechanisms mediating somatostatin-induced reduction of cytosolic free calcium in PC12 cells **Neurosci Lett.** 265: 123-126

Tseng-Crank J., Foster C. D., Krause J. D., Mertz R., Godinot N., DiChiara T. J., Reinhart P. H. (1994) Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. **Neuron** 13(6):1315-30

Tsien R. W., Lipscombe D., Madison D. V., Bley K. R., Fox A. P. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation **Trends Neurosci.** 11:431-438.

Vanetti M., Kouba M., Wang X., Vogt G., Hollt V. (1992). Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). **FEBS Lett.** 311:290-294.

Viana F., Bayliss D. A., Berger A. J. (1993). Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons **J. Neurophysiol.** 69:6 2150-63.

Viana F., Hille B. (1996) Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. **J. Neurosci.** 16: 6000-6011.

Vilchis C., Bargas J., Ayala G X., Galván E., Galarraga E (2000) Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. **Neuroscience** 95:745-752.

Vilchis C., Bargas J., Pérez-Roselló T., Salgado H., Galarraga E (2002) Somatostatin modulates Ca²⁺ currents in neostriatal neurons **Neuroscience** 109:(3) 555-567.

Vincent S. R., Johansson O., Hokfelt T., Skirboll L., Elde R.P., Terenius L., Kimmel J., Goldstein M (1983) NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. **J. Comp. Neurol.** 217:252-263

Walter P., Gilmore R., Blobel G (1984) Protein translocation across the endoplasmatic reticulum. **Cell** 38: 5-8.

Wang H., Bogen C., Reisine T., Dichter M (1989) Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:9616-9620.

Wang H., Reisine T., Dichter M. (1990) Somatostatin-14 and somatostatin-28 inhibit calcium currents in rat neocortical neurons **Neuroscience** 38 335-342

White R. E., Schonbrunn A., Armstrong D (1991) Somatostatin stimulates Ca-activated K channels through protein dephosphorylation. **Nature** 351:570-573.

White M G., Crumling M. A., Meriney S. D. (1997). Developmental changes in calcium current pharmacology and somatostatin inhibition in chick parasympathetic neurons. **J. Neurosci.** 17:(16): 6302-6313

Wilson C. J., Groves P. M. (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase **J. Comp Neurol.** 194:599-615

Wilson C J., Chang H. T., Kitai S T. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum **J. Neuroscience** 10:508-519.

Wilson C. J (1998) The basal ganglia. En Shepherd G.M. (Ed) The Synaptic organization of the brain Oxford UP, New York 279-316

Wisgrida M. E., Dryer E. D (1994) Functional dependence of Ca²⁺-activated K⁺ current on L- and N-type Ca²⁺ channels: Differences between chicken sympathetic and parasympathetic neurons suggest different regulatory mechanisms **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 2858-2862.

Zamponi G W., Bourinet E., Nelson D., Nargeor J., Snutch T. P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channels $\alpha 1$ subunit **Nature** 385:442-446.