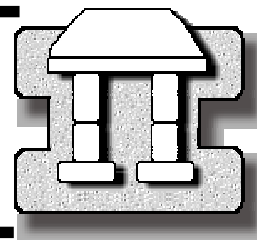




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

“Interacción de receptores GABAérgicos y Serotonérgicos en la modulación presináptica de la excitabilidad eléctrica en la corteza sensorio-motora de la rata.”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGA**

**PRESENTA:
MARÍA DOLORES IBARRA VILLA.**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO.**

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo de **Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al Dr. Jaime Barral (**IN200703**).

El trabajo experimental se llevo a cabo en el **Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias** en la **Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (U.I.I.C.S.E.)** de la **Facultad de Estudios Profesionales Iztacala** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo de Mayo de 2003 a Junio de 2004.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero. Proyecto Neurociencias U.I.I.C.S.E. FES Iztacala UNAM.**

Los resultados parciales del presente trabajo han sido aceptados para su publicación: **Torres-Escalante JL, Barral J, Ibarra-Villa D, Perez-Burgos A, Gongora-Alfaro JL and Pineda JC (2004) 5-HT_{1A}, 5-HT₂, and GABA_B Receptors Interact to Modulate Neurotransmitter Release Probability in Layer 2/3 Somatosensory Rat Cortex as Evaluated by the Paired Pulse Protocol. J Neurosci Res. (En Prensa).**

AGRADECIMIENTOS:

**A la gran mujer que más admiro en este mundo.
A ti mamá, por todo tú apoyo y comprensión mil gracias.**

A todos los Profesores que han participado a lo largo de mi formación escolar y personal, porque sin su ayuda no estuviera en este lugar, gracias por todas sus enseñanzas y consejos.

Biol. Leticia Adriana Espinosa Ávila, por ser una gran Profesora y una gran amiga, nunca olvidare sus consejos y ayuda cuando más lo necesite.

A mis Sinodales por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo y por sus comentarios:

**Dra. Berta Segura Alegría.
Dr. Juan Manuel Mancilla.
Dr. Juan Carlos Pineda Cortes.
Biol. Hugo J. Castro Cortes.**

A mi Tutor de Tesis por todo su apoyo, conocimiento y paciencia en la elaboración de este trabajo.

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

Al Dr. Juan Carlos Pineda Cortes por sus consejos y colaboración especial en este trabajo.

DEDICATORIAS:

Para ti mamá con todo mi respeto y cariño.

A mis hermanas y sobrinos.

A mis mejores amigas:

**Anel Contreras.
Cynthia Rodríguez.
Mayela Chaires.**

A mis compañeros de la generación 99-2002.

A quién ha compartido conmigo tantos momentos especiales que nunca olvidare y de quien he aprendido mucho.

José Cruz Rodríguez Alamilla.

Aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante.

La vida, en realidad, es una calle de sentido único.

Agata Christie.

El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.

Victor Hugo.

ÍNDICE.

RESUMEN. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

INTRODUCCIÓN. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FISIOLOGÍA DE LA SINAPSI. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MODULACIÓN PRESINÁPTICA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE LA SEROTONINA (5-HT). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CONSIDERACIONES ANATÓMICAS DE LA CORTEZA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CONEXIONES SINÁPTICAS EN LA CORTEZA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTERACCIÓN DE 5-HT Y GABA EN LA CORTEZA CEREBRAL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
JUSTIFICACIÓN. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

OBJETIVOS: ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

GENERALES: ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PARTICULARES: ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

MATERIAL Y METODOS. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ORGANISMOS. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
REGISTRO EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE CAMPO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PROTOCOLO EXPERIMENTAL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANÁLISIS DE DATOS. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FÁRMACOS. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

RESULTADOS. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

EL PAPEL DEL Ca^{2+} EN LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
LA PARTICIPACIÓN DE LA 5-HT EN LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR EN LA CORTEZA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
LA RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA SOBRE EL EFECTO DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE LA 5-HT. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL PAPEL DE LA 5-HT EN LA MODULACIÓN PRESINÁPTICA EN CORTEZA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL EFECTO DE LA 5-HT EN LA INHIBICIÓN PRESINÁPTICA PRODUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES $GABA_B$. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL EFECTO DEL ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES $GABA_B$ (2 OH- SACLOFEN), SOBRE LA FPP PRODUCIDA POR LA 5-HT. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

DISCUSIÓN. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

CONCLUSIONES. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

REFERENCIAS: ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

RESUMEN.

La transmisión del impulso nervioso en las neuronas se lleva a cabo mediante la transmisión sináptica. Todas las neuronas se comunican por medio de la sinapsis eléctrica o química. Además la intensidad de ambas formas de transmisión puede ser realizada ó atenuada por la actividad de la célula.

La modulación presináptica producida por la participación de receptores serotoninérgicos puede estar relacionada con una modulación indirecta a través de una vía de activación a proteínas G y segundos mensajeros que a su vez compiten ó interactúan en el sitio de acción con otros receptores. En este caso con los receptores GABA_B, los cuales se localizan en las Interneuronas inhibitoras que establecen sinapsis sobre los cuerpos celulares de las neuronas piramidales en la corteza. Por lo tanto pueden ejercer una influencia inhibitora directa sobre la génesis de los potenciales de acción en el segmento inicial del axón.

Los cambios provocados por la administración de los diferentes fármacos como el Baclofen agonista del receptor GABA_B, (1 μ M), y el antagonista 2OH-saclofen (150 μ M), muestran en la sinapsis cortical que la FPP aumentó cuando la probabilidad de liberación del neurotransmisor era baja y disminuyó cuando la probabilidad de liberación era alta. En el caso de la 5-HT se demostró que reduce corrientes de Ca²⁺, deprimiendo la transmisión sináptica excitatoria, es decir actuó inhibiendo la transmisión glutamatérgica en las neuronas de la capa 2/3 de la corteza sensorio-motora de la rata. Sin embargo el efecto observado de la 5-HT, fue dependiente de la concentración (0.03-4 μ M) con una EC50 de 0.236 μ M, obtenida de la curva dosis respuesta.

En general los resultados muestran que los mecanismos de transmisión serotoninérgica participan modulando indirectamente vía activación de proteínas G y segundos mensajeros al receptor GABA_B en la corteza cerebral de los mamíferos.

PALABRAS CLAVE: Modulación presináptica, 5-HT, GABA_B, Corteza, Baclofen y 2-OH saclofen.

INTRODUCCIÓN.

Fisiología de la sinapsis.

En el sistema nervioso existen sitios de contacto funcionales para la transferencia de información entre las neuronas, estos son de gran importancia para la comprensión de los mecanismos cerebrales. Aquí las neuronas pueden ser excitadas, inhibidas o moduladas por la transmisión sináptica. A estos sitios se les llama sinapsis, ya que están constituidos estructuralmente por el componente presináptico, el componente postsináptico y el espacio o hendidura entre ellas (Katz, 1966; Kandel et al, 2000; Hammond et al, 2001, Johnston y Wu, 1995; Zimmerman, 1993).

La comunicación intercelular por la transmisión sináptica se puede establecer en diferentes regiones de la neurona; estableciéndose sinapsis de diversos tipos como axo-dendríticas, dendro-dendríticas, axo-somáticas y axo-axónicas las cuales llegan a formar redes neuronales o microcircuitos (Salín, 1999; Zimmerman, 1993). Por otro lado, la transmisión sináptica puede ser clasificada de acuerdo al mecanismo de transmisión que se utilice para el paso de la información y estas pueden ser sinapsis eléctricas o químicas (John, 2001; Hammond, 2001 Kandel et al., 2000).

En la sinapsis eléctrica hay una transferencia directa de iones, donde la corriente generada en la terminal presináptica se propaga hacia la célula postsináptica de un extremo a otro bajo la resistencia de canales, denominada unión estrecha o unión comunicante, formada por conexinas; se trata de un tipo

de transmisión rápida y frecuentemente bidireccional. (Simon y Goudenough, 1998).

En la sinapsis química hay una liberación de sustancias con actividad biológica conocidas como neurotransmisores, los cuales son almacenados en las vesículas sinápticas, y posteriormente liberados por la exocitosis en la hendidura de la célula presináptica dirigiéndose hacia la célula postsináptica por medio de la fijación a receptores específicos, modificando así su permeabilidad a los iones. (John, 2001; Johnston y Wu, 1995; Kandel et al, 2000; Hammond, 2001). Por otra parte la liberación del neurotransmisor en la sinapsis química difiere de otras vías secretoras en dos elementos esenciales: a) La secreción está estrechamente acoplada al arribo del potencial de acción a las terminales axónicas, y b) Las vesículas sinápticas son recicladas en la terminal, por fusión con la membrana plasmática, en un proceso que tarda unos cuantos milisegundos (Fig.1) (Hammond, 2000, Hille, 2001; Lodish et al., 2002).

La sinapsis química puede ser tanto excitatoria (acercando el potencial de la membrana hacia el umbral de disparo) como inhibitoria (alejando el potencial de la membrana del umbral de disparo). (Hille, 2001; John, 2001). Además, la terminal sináptica es susceptible de ser regulada por cambios dependientes de la actividad en la función sináptica (Hammond, 2001).

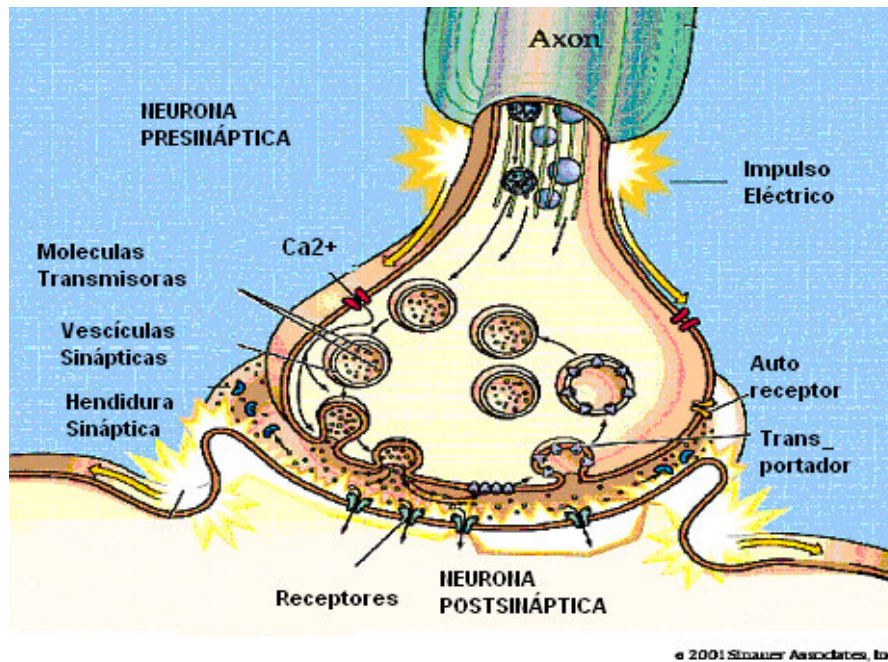


Figura 1. Sinapsis química. La figura muestra la descarga de un impulso eléctrico (Depolarización) a la neurona presináptica, desencadenando la entrada de Ca^{2+} , movilizando y fusionando las vesículas hacia la terminal sináptica para la liberación de moléculas del neurotransmisor, el cual es recibido por los receptores de la neurona postsináptica.

Modulación presináptica.

La modulación, es un importante proceso que interviene en numerosas funciones nerviosas como: reflejos espinales, activación sensorial, aprendizaje y memoria, entre otros. Se lleva acabo en la terminal presináptica a través de canales de Ca^{2+} que se establecen por la activación de receptores que se unen a proteínas G, los cuales producen una disminución en las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje al cambiar las propiedades de estos canales (López y Brown, 1992; Wu y Saggau, 1997). De tal forma que las modificaciones a corto y largo plazo de las respuestas neuronales o de la transmisión sináptica resultan de la modulación de los canales de Ca^{2+} (López y Brown, 1992). A su

vez estos mecanismos moduladores son sitios de numerosas enfermedades de carácter hereditario o adquirido.

Entre las vías modulatorias mediadas por proteínas G, aquellas que involucran canales de Ca^{2+} , tienen un alto impacto sobre la fisiología de la neurona. Puesto que la entrada de Ca^{2+} además de contribuir a la liberación del neurotransmisor evoca diferentes respuestas celulares, tales como la apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , la propagación del impulso nervioso, reacciones enzimáticas y la transcripción de genes. Evidencia previa muestra que los moduladores presinápticos inhiben a los canales de Ca^{2+} y activan canales de K^+ en la terminal presináptica (Wu, Saggau 1997 y Miller, 1998).

La activación de los receptores presinápticos por diversos neurotransmisores y neuromoduladores puede producir inhibición en la liberación del neurotransmisor. Sin embargo la inhibición presináptica puede servir como medio para ajustar la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación del neurotransmisor (Miller, 1998). En términos generales, pueden existir dos tipos de receptores, tanto presinápticos como postsinápticos: Aquellos que se constituyen como una unidad receptor-canal, es decir receptores ionotrópicos. O aquellos en los que el receptor es una estructura independiente y está acoplado a los canales por proteínas G, conocidos como receptores metabotrópicos (Hammond, 2001).

Entre las diferentes sustancias liberadas de las terminales nerviosas, que actúan en la transmisión sináptica química, se encuentran los neurotransmisores acetilcolina (ACh), ácido γ -amino butírico (GABA), glutamato

y glicina, en ellos el canal y el receptor constituyen una sola unidad (Hammond, 2001). Existen, además otros receptores a sustancias entre las que se encuentra la dopamina, opiáceos, serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) y la adrenalina. Estas sustancias se unen a receptores metabotrópicos en donde el receptor y el canal efector constituyen unidades independientes y separadas entre sí. A este tipo de sustancias, se les considera como neuromoduladores ya que, actúan tanto pre- como postsinápticamente regulando la cantidad de neurotransmisor liberado (Hammond, 2001, Kandel et al, 2000; López y Brown, 1992).

De tal forma que las aminas biogénicas como 5-HT ejercen efectos neuromodulatorios sobre el sistema nervioso activando cadenas de mensajeros y vías metabólicas intracelulares que transforman las funciones neuronales por periodos prolongados. A diferencia de los neurotransmisores clásicos como acetilcolina, GABA, glutamato, y glicina, que ejercen efectos directos y rápidos cuando sus receptores son activados. Por lo que se ha postulado que mientras los neurotransmisores clásicos excitan e inhiben la transmisión de señales en el sistema nervioso, las aminas biogénicas, lo modulan (Nicoll, 1998).

Farmacología y Fisiología de la serotonina (5-HT).

Uno de los neuromoduladores a nivel cortical es la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), que actúa en diferentes receptores tanto pre- como postsinápticamente, modulando la función neuronal (Bortolozzi, et al., 2003).

La serotonina participa en muchas funciones fisiológicas, entre ellas el sueño, función cognoscitiva, percepción sensorial, actividad motora, regulación de la temperatura, nocicepción, apetito, conducta sexual y secreción de hormonas. Así como también está involucrada en la generación de trastornos psiquiátricos como depresión, ansiedad, fobia social, esquizofrenia, obsesividad compulsiva, trastornos de pánico, además de participar en enfermedades como la migraña y la hipertensión (Hoyer, et al., 2002, Foehring, et al., 2002, Grimaldi y Fillion, 2000).

Esta amina (5-HT), fue descubierta en el exterior del sistema nervioso. Su presencia se determinó a mediados del siglo XIX gracias a los trabajos de Stevens y Lee en 1884, como un factor del suero sanguíneo que causaba fuertes contracciones en los órganos del músculo liso; etimológicamente quiere decir: *seros* = suero, *tone* = tono o fuerza, y de ahí recibe su nombre. Fue descrita inicialmente como una enteroamina vasoactiva del suero (Rapport, Green, et al., 1947 *cit.* Goodman, Gilman, 1997) y posteriormente identificada como un neuromodulador ampliamente difundido en el sistema nervioso (Amin et al., 1954).

El precursor de la 5-HT es el aminoácido esencial triptófano, el cual entra con facilidad al SNC (sistema nervioso central). La hidroxilasa de triptófano (HTr), es la primera enzima del proceso sintético y utiliza como cofactores el oxígeno molecular y la l-eritro-tetrahidrobiopteridina (THBP) (Salín, 1999).

Los principales cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas se localizan en los núcleos del rafe del tallo encefálico, y se proyectan por todo el cerebro y la medula espinal (Fig. 2). Además de descargarse en sinapsis definidas, las pruebas con que se cuenta sugieren que se produce también liberación de serotonina en varicosidades no sinápticas lo cual es compatible con la hipótesis sostenida desde hace tiempo, de que la 5-HT puede actuar como neuromodulador y como neurotransmisor (Goodman y Gillman, 1997). En la corteza cerebral, las interneuronas GABAérgicas y las neuronas piramidales reciben inervación serotoninérgica de estos núcleos (Varga, et al., 2001).

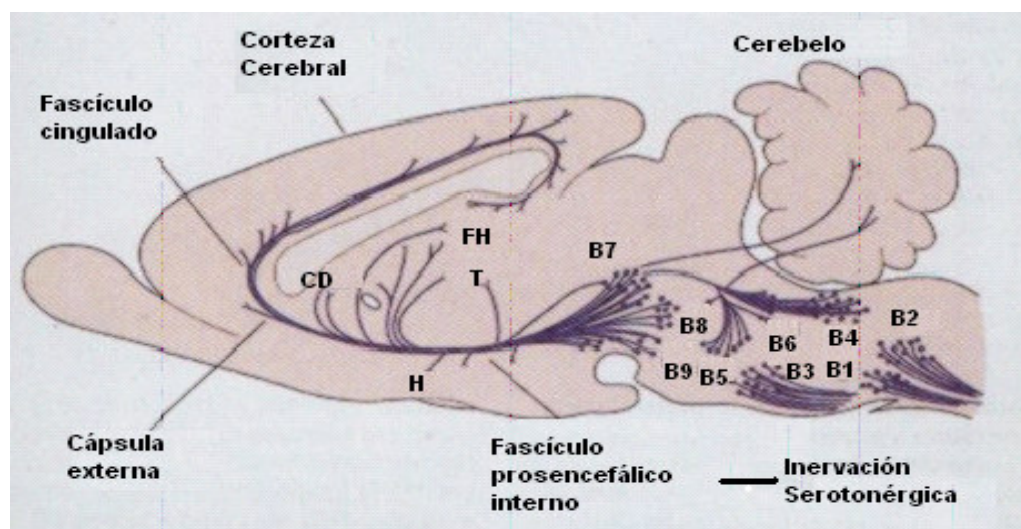


Figura 2. Proyecciones serotoninérgicas. Las neuronas de los grupos B1-3, corresponden a los núcleos del rafe magno y el rafe pálido, se proyectan a la parte inferior del tronco encefálico y médula espinal. Las neuronas de los grupos B4-9, que incluye los núcleos de los rafe pontino, mediano y dorsal, se proyectan a la parte inferior del tronco encefálico, el hipotálamo, el tálamo y la corteza cerebral. CD= núcleo caudado; FH= formación del hipocampo; H= hipotálamo; T= tálamo.

Se ha reportado en el cerebro de gato, que la 5-HT participa en la modulación de las vías receptoras de información, donde la disminución de la 5-HT, reduce las áreas corticales sensoriales de la capa IV relacionadas con las vibrisas en gato y en rata (Bennett, Lane et al., 1995).

La clasificación de los receptores de la 5-HT inició en 1957, cuando fueron demostradas trabajando en un cerebro de cobayo, que la respuesta funcional puede ser parcialmente bloqueada por morfina, y totalmente por otro fármaco (Divenalin) esto permitió a Goodman y Picarelli proponer una subdivisión de estos receptores. Consecuentemente en 1976, Bennett y Zinder postularon la teoría de la presencia de receptores de la 5-HT, donde se utilizaron técnicas relacionadas a radio ligando, en membranas corticales de rata, comprobando la presencia de estos receptores.

En 1986, Bradley elaboró una clasificación de los receptores de la 5-HT, donde propone considerar 3 grupos de receptores: 5-HT₁ típico, 5-HT₂ y 5-HT₃; basándose principalmente en su estructura e información transduccional. Actualmente se encuentra dividida en siete familias (5-HT₁ a 5-HT₇) con más de 13 clases diferentes de receptores subtipo, con la excepción de la 5-HT₃, la

cual es el único receptor-canal dependiente de ligando, las demás corresponden a una superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (ver Tabla 1) (Hoyer, et al., 2002)

Tabla 1: Receptores serotoninérgicos (5-HT).

Receptor subtipo	Proteína G	Canal iónico	Respuesta Fisiológica
5-HT ₁	G _i /G _o	K ⁺ , Ca ²⁺	Inhibición lenta
5-HT ₂	G _{q/11}	K ⁺	Excitación lenta
5-HT ₃	Ligando	Na ⁺ / K ⁺	Excitación rápida
5-HT ₄	G _s	I _K ⁺ , I _K ^{+(Ca²⁺)}	Excitación lenta
5-HT ₅	Se ignora	Se ignora	Se ignora
5-HT ₆₋₇	G _s	Se ignora	Se ignora

(Tomada de Baumgarten y Göthert, 1999).

Las consecuencias fisiológicas de la liberación de la 5-HT varían según la región del cerebro y el elemento neuronal participante, lo mismo que con la población de subtipos de receptores de la 5-HT que se expresa en los diversos tipos de neuronas, aunque es probable que en algunas de ellas se expresen múltiples subtipos de receptores con acciones semejantes u opuestas, lo cual ocasiona la enorme diversidad de efectos que pueden ser acciones excitadoras e inhibitoras directas que ocurren en la misma preparación pero con patrones temporales diferentes (Goodman y Gillman, 1997).

Estudios recientes en la rata adulta, mostraron que la 5-HT produce un incremento alto pero transitorio, en la amplitud de los potenciales sinápticos inhibitorios y un incremento menor pero de mayor duración de los sinápticos excitatorios mediados por receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ respectivamente. Sin embargo, la influencia de este neuromodulador sobre la actividad eléctrica de las neuronas neocorticales, aún no se ha comprendido en su cabalidad. No obstante el papel de la 5-HT sobre esta actividad ha sido estudiado utilizando la preparación de rebanadas de cerebro de rata mantenida en condiciones in vitro (Zhou y Hablitz, 1999).

Farmacología y Fisiología del ácido γ -amino butírico (GABA).

La neurotransmisión de tipo inhibitorio en el SNC de los mamíferos es controlada por el γ -amino butírico (GABA). Farmacológica y fisiológicamente hay estudios que indican el control inhibitorio en la excitabilidad neuronal dada por el GABA el cual es mediado por la activación de los receptores ionotrópicos (GABA_{A/C}) y de su receptor metabotrópico (GABA_B) (Bischoff, et al., 1999). En la mayor parte de los circuitos sinápticos del cerebro, las interneuronas que regulan los sistemas de proyección, están constituidas por neuronas GABAérgicas (Wang, et al., 2002).

El GABA fue descubierto en forma independiente en 1950 por Roberts y Awapara. Posteriormente Kuffler y Edwards demostraron su papel como neurotransmisor en la sinapsis de crustáceos. Por último, Obata y Takeda

comprobaron su presencia en el IV ventrículo después del estímulo en las células de Purkinje (Salín, 1999).

El precursor del GABA es el glutamato, aunque *in vivo* el piruvato y otros aminoácidos también sirven como precursores, ya que todos ellos intervienen en el ciclo de Krebs. La síntesis se lleva a cabo a partir del glutamato en una reacción catalizada por la enzima α -cetoglutarato, que lo convierte en ácido glutámico (GAD) (Kandel, 2000). En su fase catabólica, éste se somete a transaminación por la transaminasa de GABA (GABA-T) para formar semialdehído succínico; no obstante esta reacción sólo se lleva a cabo si el α -cetoglutarato acepta el grupo amino. Ello lo transforma de nuevo en glutamato (Salín, 1999). Su distribución es extensa en todo el SNC, pero los sitios en donde se encuentra en mayor concentración son: neocorteza, hipocampo, ganglios basales, hipotálamo, cerebelo, amígdala y médula espinal (Bischoff, et al., 1999).

La actividad inhibitoria del GABA es mediada por una variedad de tipos y subtipos de receptores, los cuales incluyen a GABA_A como un receptor-canal que permite el paso de Cl⁻, ocasionando una hiperpolarización en la membrana postsináptica, produciendo un efecto inhibitor clásico.

El segundo tipo de receptor GABA_B es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G que actúa tanto en las vías bioquímicas como en la regulación de los canales iónicos (Bowery, 1993). La activación de este receptor tiene un papel modulador a nivel pre- y postsináptico en la liberación de varios neurotransmisores en las terminales sinápticas de diversos

núcleos, incluyendo glutamato, noradrenalina, dopamina, serotonina y somastostatina entre otros (Barral et al, 2000; Bischoff, et al., 1999 y Zhang, et al., 2000). Ello debido a las conductancias de potasio rectificadoras entrantes acopladas a proteínas G en las neuronas (Sodickson y Bean, 1996), es decir su acción se asocia con una menor entrada de Ca^{2+} extracelular a la terminal presináptica (Gage, 1992 y Miller, 1998), modulando la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje del tipo P/Q (Barral, et al., 2000; 2001), generando una reducción en la depolarización producida por la llegada del potencial de acción en la terminal sináptica.

Dependiendo del área del cerebro donde se encuentre el receptor $GABA_B$, también puede participar en desordenes neurológicos como degeneración y muerte de las células de Purkinje, en la generación de las enfermedades como Parkinson (degeneración de neuronas dopaminérgicas), Huntington (desorden asociado con la disrupción del circuito de los ganglios basales) y con la activación de ataques epilépticos.

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de un alto nivel de concentración de GABA en las interneuronas de la corteza cerebral, teniendo un papel importante en el control de la actividad neuronal producida por estimulación eléctrica en áreas adyacentes. En adición el receptor $GABA_B$ actúa regulando la liberación del neurotransmisor en la corteza cerebral (Suzdak et al., 1994).

Consideraciones anatómicas de la corteza.

En los mamíferos la corteza está formada por una mezcla de fibras nerviosas, neuroglia y vasos sanguíneos. Su organización se compone de seis capas celulares, donde encontramos a un enorme grupo de neuronas clasificadas de acuerdo a su distribución a través de las capas, al tipo de conexión sináptica que forman y a las características morfológicas que presentan (Fig.3) (Mountcastle, 1998). De tal manera que podemos encontrar a las neuronas Piramidales, Espinosas ó Estrelladas, en cesto ó Cajal, Martinotti, Chandelier (candelero), Double bouquet (doble penacho), algunas células intersticiales y otras péptidicas dentro del circuito cortical.

La estructura de las capas se presenta de la siguiente forma:

La capa 1 conocida como estrato molecular, (capa plexiforme), está ocupada por las dendritas de células situadas a mayor profundidad y por axones que la atraviesan, los cuales forman sus conexiones en esta capa. Consta principalmente de una densa red de fibras nerviosas orientadas tangencialmente, derivadas de las dendritas apicales de células piramidales, de axones de las células espinosas y de las células de Martinotti. Es la capa más superficial de la corteza en donde se origina una gran cantidad de sinapsis entre las diferentes neuronas.

La capa 2 está compuesta fundamentalmente por pequeñas células esféricas llamadas granulosas por lo tanto se le denomina estrato gránuloso externo. Además contiene una gran cantidad de pequeñas células piramidales y algunas células espinosas. Las dendritas de estas

células terminan en la capa molecular y los axones se dirigen a capas más profundas, donde terminan o continúan para entrar en la sustancia blanca del hemisferio cerebral.

La capa 3 esta capa se denomina estrato piramidal externo o neuronal contiene diversos tipos celulares, muchos de los cuales son de forma piramidal, además es típico que las neuronas localizadas en la parte profunda de la capa sean mayores que las superficiales. Las dendritas apicales se dirigen a la capa molecular y los axones entran en la sustancia blanca como fibras de proyección, de asociación o comisurales.

La capa 4 al igual que la capa 2, está compuesta fundamentalmente por granulosas y se denomina estrato granuloso interno. Esta compuesta por células espinosas en forma muy compacta y una gran concentración de fibras dispuestas horizontalmente conocidas colectivamente como la banda externa de Baillarger.

La capa 5 (Capa ganglionar), también recibe el nombre de estrato piramidal interno, está constituida por células de forma piramidal que por lo general son mayores que en la capa 3, conocidas también como células de Betz. Acompañadas por las interneuronas espinosas, las neuronas de Martinotti y un gran número de fibras dispuestas horizontalmente que forman la banda interna de Baillarger.

La capa 6 conocida como capa multiforme (capa de células polimórficas). Aquí la mayoría de las células es fusiforme, aunque muchas son células piramidales modificadas cuyo cuerpo celular es triangular u ovoideo. También podemos encontrar a las células de Martinotti y a muchas fibras nerviosas que entran en la sustancia blanca subyacente o salen de ella (Kandel, et al., 2000, Thonsom y Bannister, 2003).

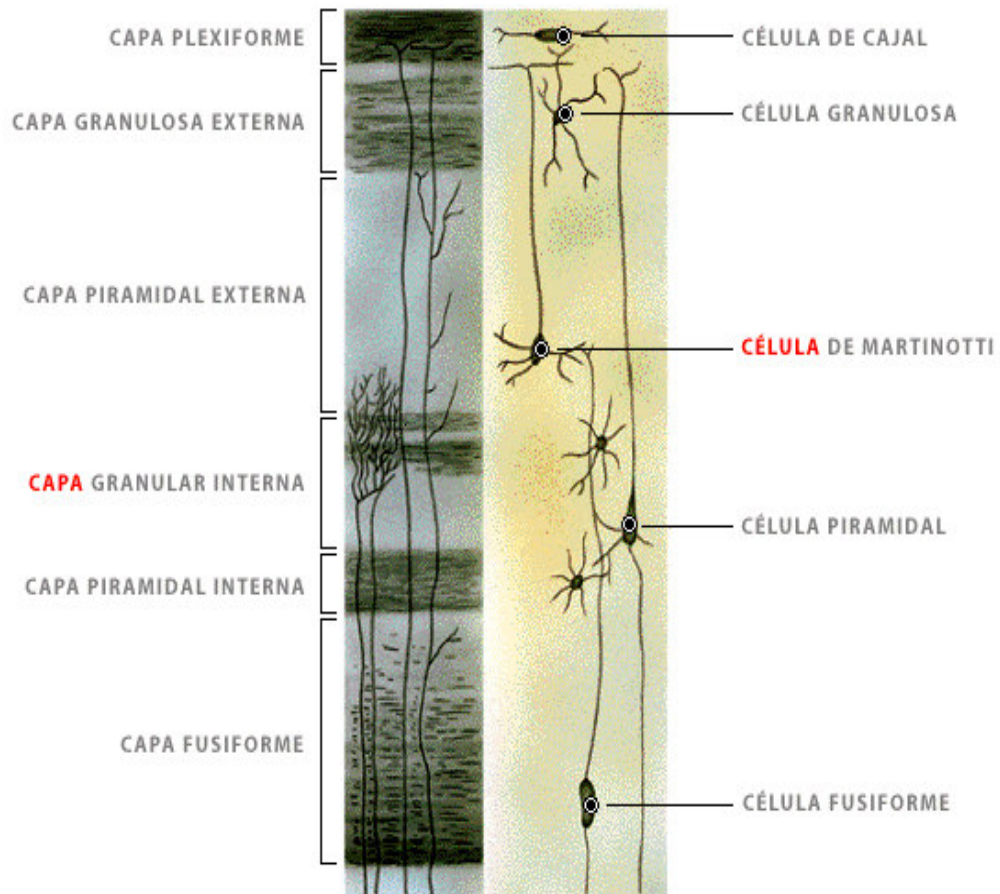


Figura 3. Corteza cerebral. Estructura de la corteza cerebral formada por seis capas caracterizadas de acuerdo al tipo de neuronas que habitan en ellas, como por ejemplo podemos encontrar en gran mayoría a las neuronas piramidales las cuales llegan a extenderse a diferentes capas, estableciendo conexiones con las interneuronas, en este caso como lo muestra la imagen observamos a las interneuronas de Martinotti y de Cajal, entre células fusiformes y Granulosas.

Conexiones sinápticas en la corteza.

Las diferentes aferencias que acceden a la corteza parecen ser procesadas de manera diferente, y las eferencias a su vez proceden de distintas poblaciones de neuronas (Mountcastle, 1998). La estructura en capas de las neuronas proporciona un medio eficiente para organizar las relaciones de aferencias-eferencias de las neuronas corticales las cuales están especializadas en varios procesos y operaciones determinadas por este tipo de relaciones o conexiones neuronales (Fig. 4) (Arbib et al, 1998; Mountcastle, 1998).

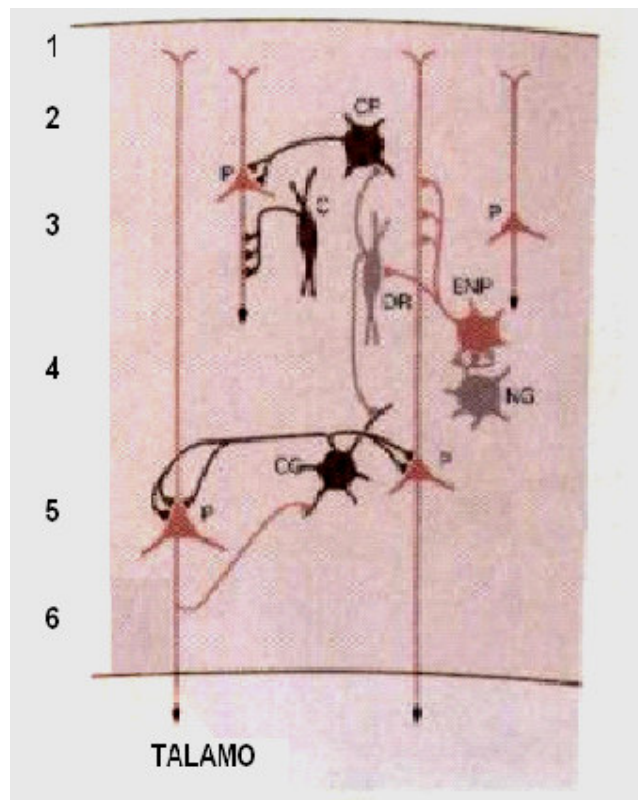
La corteza, recibe aferencias principalmente del tálamo las cuales se dirigen hacia la capa 4, así como de otras regiones subcorticales como el claustrum, locus coeruleus, tallo cerebral, sistema reticular y del núcleo del Rafe dorsal y medial (Rodney y Kevan, 1998 cit., Shepherd, 1998). De igual manera las eferencias de la corteza se dirigen también a varias regiones de la corteza, encefalo, ganglios basales y médula espinal (Kandel, 2000).

La información pasa sucesivamente desde el centro donde se procesa a otro, así la información que ingresa a la corteza de la capa 4 es proyectada a las capas más superficiales (capas 2 y 3), formando circuitos cortico-corticales característicos (Arbib et al, 1998; Mountcastle, 1998).

En general las neuronas de la corteza, se pueden definir en un sentido amplio como neuronas de proyección e interneuronas (neuronas locales). Las neuronas de proyección típicas tienen somas de forma piramidal. Se localizan fundamentalmente en las capas 3, 5 y 6. Participan en las sinapsis asimétricas, empleando al neurotransmisor excitatorio glutamato (Rodney y Kevan, 1998

cit., Shepherd, 1998). Las dendritas apicales de estas neuronas establecen sinapsis con neuronas del circuito cortico-cortical de otras capas (1, 2, 3 y 4). Mientras que las neuronas de las capas 5 y 6 proyectan sus axones a núcleos externos a la corteza como los ganglios basales, médula espinal etc. (Arbib et al, 1998).

Las interneuronas utilizan al neurotransmisor inhibidor GABA, las cuales constituyen entre el 20 y el 25% de las neuronas localizadas en todas las capas. Basándose en los tipos de conexión que realizan, se han diferenciado varios tipos de interneuronas GABAérgicas, algunas poseen axones que terminan sobre los cuerpos celulares de las neuronas en cesta y otras tienen axones que terminan exclusivamente sobre los axones de las células glutamatergicas (Thomson y Bannister 2003); las múltiples series de terminales sinápticas formadas por estos axones GABAérgicos suelen llamarse neuronas de Chandelier ó de candelabro que estimulan a varias columnas corticales. Otras neuronas GABAérgicas contienen péptidos neuroactivos como la somatostatina, la colecistocinina o los péptidos opiodes. Sin embargo no todas son inhibitorias, también existe una población de interneuronas excitadoras, que se localizan fundamentalmente en la capa 4 y 3. Se caracterizan por tener un plexo estrellado de dendritas, conocidas como neuronas espinosas que utilizan como transmisor al glutamato y forman sinapsis con neuronas próximas al cuerpo celular. Estas interneuronas son las receptoras primarias de la información sensitiva que recibe la corteza procedente del tálamo (Fig. 4) (Mountcastle, 1998; Rodney y Kevan, 1998).



(Tomada de Kandel, et al., 2000)

Figura 4. Circuito cortical, donde se muestran las distintas conexiones que se establecen entre los diferentes tipos de células en este caso las GABAérgicas (gris oscuro), las cuales se conectan con las células piramidales (P) y representan al mayor número de interneuronas en la corteza como las células espinosas no piramidales (ENP), las células de chandelier (candelabro) (C) y las células en cesta grandes y pequeñas (CG, CP), cuyos axones terminan fundamentalmente en otros cuerpos celulares. También pueden ser GABAérgicas las células en doble ramo (DR) y las neurogliaformes (NG).

Interacción de 5-HT y GABA en la corteza cerebral.

Las proyecciones serotoninérgicas procedentes del núcleo del rafe dorsal que alcanzan la corteza cerebral establecen conexiones sinápticas, donde más de una docena de receptores serotoninérgicos han sido descritos (Hoyer et al., 2002, Föehring et al., 2002). Aquí la 5-HT modula la transmisión sináptica y puede provocar un incremento en la excitabilidad neuronal mediante la activación de sus receptores. Estos receptores pueden inducir la activación de una corriente entrante en la membrana postsináptica que incrementa la amplitud del potencial sináptico excitatorio o simplemente, depolarizar la membrana activando una corriente catiónica (Zhou y Hablitz, 1999). Sin embargo las diversas funciones de la 5-HT, la modulación en la corteza, y la diversidad del tipo de células y sus múltiples receptores subtipo, determinan un difícil papel en la función cortical.

El mecanismo por el cual pudiera ocurrir una interacción entre la 5-HT y el GABA, en particular como la 5-HT modula la liberación de GABA, no se ha comprendido (Koyama et al, 1999). Se ha reportado que la 5-HT inhibe las respuestas de las neuronas de la corteza sensorio-motora y altera los campos de la memoria en la corteza prefrontal (Williams, et al., 2002, Föehring, et al., 2002). También puede provocar un incremento en la inhibición en las interneuronas GABAérgicas, reduciendo la amplitud del potencial sináptico en la corteza entorrinal (Schmitz, et al., 1999). Además ocasiona inhibición presináptica en las terminales glutamatérgicas intracorticales en las neuronas de la corteza visual de la rata y en la amígdala basolateral (Koyama, et al., 1999; Schmitz, et al., 1999). Por otro lado se ha propuesto que la liberación

fisiológica de la 5-HT puede ser regulada por distintos subtipos de receptores GABA tanto en sitios presinápticos como postsinápticos. En ese sentido, también los agonistas de receptores GABA inhiben la liberación de la 5-HT en el estriado y la corteza confirmando que esta sustancia puede actuar como un modulador presináptico (Tao et al, 1996).

Sin embargo recientes estudios electrofisiológicos también han demostrado una poderosa influencia inhibitoria por neuronas serotoninérgicas, provenientes del núcleo del rafe dorsal, en la corteza prefrontal media. Por otra parte la corteza establece contactos en todo el núcleo del rafe dorsal. Estos contactos pueden ser predominantemente sinapsis simétricas (sinapsis de tipo inhibitorio) que establecen contacto con interneuronas GABAérgicas (Varga, et al., 2001).

Las acciones de la 5-HT en la corteza ocurren principalmente en las neuronas piramidales de la capa 5, en ese sentido se ha reportado una inhibición producida por la 5-HT (Tanaka, et al., 1993, Spain 1994, Marek et al., 1999; Föehring, et al., 2002), que involucran la activación de receptores 5-HT_{1A} y aumentan la conductancia de potasio. Alternativamente, la 5-HT también puede disminuir la excitabilidad neuronal activando receptores como 5-HT_{2A}, que a su vez han sido encontrados en las terminales de las interneuronas GABAérgicas, las cuales inhiben tónicamente a las neuronas piramidales, teniendo influencia en la activación simultánea de la 5-HT y de los receptores GABA_B, en la capa 2/3 de la corteza entorrinal (Schmitz, et al., 1999). Estos datos proveen la primera evidencia de la actividad e influencia entre la corteza y el núcleo del rafe dorsal por neuronas serotoninérgicas y neuronas locales

GABAérgicas. Este circuito predice cambios fisiológicos y patológicos en la corteza, con impacto en partes significantes del sistema serotoninérgico (Varga, et al., 2001).

JUSTIFICACIÓN.

El interés de este trabajo se ha centrado en conocer el papel que tiene la activación simultánea de los receptores GABAérgicos y serotoninérgicos en la modulación presináptica producida en la capa 2/3, sobre la respuesta a la estimulación eléctrica en las poblaciones de neuronas en la capa 5 de la corteza sensorio-motora de la rata. Estudios de este tipo, a su vez permiten el desarrollo de nuevas investigaciones que darán paso al desarrollo de fármacos selectivos de subtipo, lo mismo que incrementa nuestro conocimiento sobre las diversas acciones de estos receptores, a nivel molecular. En este sentido, se puede buscar un número creciente de finalidades terapéuticas mediante el diseño de fármacos, que ayuden a mejorar los tratamientos para las diversas enfermedades mentales generadas en la corteza.

OBJETIVOS:

Generales:

- Describir los mecanismos de modulación presináptica producida por la activación de los receptores serotoninérgicos en la corteza sensorio-motora de la rata.
- Establecer la importancia de la activación simultánea de diferentes neuromoduladores sobre el funcionamiento de este microcircuito cerebral

Particulares:

- Determinar la modulación presináptica de la sinapsis de neuronas corticales de la capa 2/3 producida por la activación de receptores serotoninérgicos en la corteza sensorio-motora de la rata adulta.
- Estimar cuál es la concentración necesaria de la 5-HT que se requiere para producir la modulación presináptica en la excitabilidad de sinapsis neocorticales en cerebro de rata.
- Analizar la posible interacción que la 5-HT ejerce sobre la modulación producida por activación de receptores GABAérgicos en la capa 2/3 de la corteza sensorio-motora en la rata adulta.

MATERIAL Y METODOS.

Organismos.

Para estudiar la influencia de la serotonina sobre la excitabilidad global en la corteza sensorio-motora, se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 100 a 120 g, del sexo masculino.

Las ratas fueron mantenidas en el bioterio de esta institución con ciclos de 12 x 12 hrs. de luz y oscuridad, con agua y alimento proporcionado *ad libitum*.

Se anestesiaron con éter etílico (en algunos experimentos se utilizó pentobarbital como agente anestésico, sin que hubiera diferencias en las respuestas observadas), inmediatamente después fueron decapitadas. El cerebro fue removido del cráneo y depositado en solución salina fisiológica, que contiene, 125.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃, 11.0 glucosa (todos en mM) gasificada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ y un pH de 7.4. En esta etapa la preparación se mantiene a baja temperatura. Posteriormente se seccionaron los bulbos olfatorios y el cerebelo ocupando únicamente los hemisferios cerebrales, los cuales fueron colocados en un vibratomo (Campdeen, UK) para la obtención de rebanadas sagitales de 400 µm de espesor, mismas que se mantuvieron en incubación a una temperatura ambiente por un periodo no menor a los 60 min. En estas condiciones fue posible obtener registros confiables con más de 10 hr de duración (Barral et al, 2001; Flores-Hernández et al, 1997, Hernández –Echegaray et al, 1998).

Registro Electrofisiológico.

Para el registro electrofisiológico de los potenciales de campo, la rebanada se trasladó a una cámara de registro a la que se le administró un flujo continuo de solución fisiológica (1 a 2 ml/min). Se utilizaron técnicas convencionales de amplificación y registro. Para ello, se emplearon electrodos de vidrio fabricados a partir de capilares de borosilicato de 1.0 mm de diámetro externo, con una resistencia en la punta de 2 a 4 M Ω , con NaCl al 0.9 % como conductor. Los registros se obtuvieron de la capa 2/3 en la corteza sensorio-motora de la rata.

El potencial de campo se amplificó y desplegó en el osciloscopio, se digitalizó y almacenó en vídeo, mediante programas desarrollados en el laboratorio en el ambiente LabView (National Instruments, Austin TX. U.S.A.). Posteriormente los registros fueron analizados, promediados y graficados utilizando el software comercial (Origin, Microcal Software, Northampton, MA. U.S.A.).

Registro Extracelular de potenciales de campo.

Los potenciales de campo son registros extracelulares de las corrientes iónicas asociadas a la actividad de una población de neuronas. Las corrientes producen espigas poblacionales debido al disparo sincrónico de potenciales de acción de muchas neuronas (Malenka y Kocsis, 1988). La amplitud de estas espigas depende de la cantidad de células que disparen simultáneamente, así como de la distribución de la población neuronal activa y de la resistencia del tejido. Además el potencial de campo registrado extracelularmente es una onda trifásica producida por la diferencia de potencial ocasionada por el cambio en la

localización de sumideros (corrientes entrantes activas) y de las fuentes (corrientes salientes que cierran el circuito) (Cordingley y Weight, 1986; Jonhston y Wu, 1995; Malenka y Kocsis, 1988). En un registro extracelular, las corrientes salientes se observan como deflexiones positivas en el registro, mientras que las corrientes entrantes se observan como deflexiones negativas (ver Fig. 5) (Barral et al., 2001; Malenka y Kocsis, 1988). El componente negativo corresponde a la despolarización de la membrana del soma por el flujo de corriente entrante. La fase positiva corresponde a la reversión en el flujo de corriente (Barral et al., 2001; Malenka y Kocsis, 1988). Para la estimulación se utilizaron electrodos concéntricos bipolares (150 – 200 μm de diámetro), con los que se envían pares de pulsos cuadrados de corta duración (0 - 40 V, 0.1 - 0.06 Hz; 100 - 200 μs) desde la capa 4/5 de la corteza sensorio-motora. La medición que hace el electrodo se realiza comparando los voltajes entre el electrodo de registro y la tierra de referencia.

En la sinapsis cortical como en otras regiones del cerebro observamos que el potencial de campo muestra dos tipos de deflexiones negativas en el registro (Fig. 5). La primera de ellas N_1 , que aparece en el rango de 4 a 8 ms después del artefacto de estimulación, siendo de origen antidrómico y se debe a la acción de estimular el axón de las neuronas (Bargas et al. 1998; Barral et al, 2000; 2001; Cordingley y Weight, 1986; Malenka y Kocsis, 1988), siendo bloqueado por procaína y TTX. Posteriormente se observa la segunda deflexión negativa (N_2) en el rango de 8 a 12 ms, de origen ortodrómico ó sináptico (Bargas, 1998, Cordingley, 1986, Lovinger, 1993 y Malenka, 1998), el cual se obtiene cuando las aferentes llegan al árbol dendrítico o al soma de la

Para el estudio de eventos presinápticos se utiliza comúnmente el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP), el cual se basa en la hipótesis del calcio residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's (Katz y Miledi, 1967a; 1967b; 1968; 1970). Este protocolo consiste en mandar dos estímulos de la misma intensidad en un intervalo corto de tiempo, la amplitud de la respuesta al segundo estímulo (condicionada) generalmente es mayor a la observada en la primera respuesta (condicionante), este fenómeno se debe a que con la llegada del primer estímulo se abren canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando la concentración intracelular de calcio (Katz, y Miledi 1968,1970). Sin embargo el proceso de liberación del neurotransmisor dura muy poco tiempo (Barret y Stevens 1972), por lo que no todo el calcio que entra con el primer estímulo (S_1) es utilizado y permanece varios milisegundos en el sitio de liberación, debido a la lentitud de amortiguamiento del calcio con relación al evento sináptico (Charlton y Smith, 1982), por lo que con la llegada de un segundo estímulo (S_2) el calcio que entra con el nuevo estímulo se suma al calcio residual que ingresó a la terminal con el primer estímulo (Andreasen y Hablitz, 1995). Al menos durante un período muy breve de tiempo la concentración de calcio es mayor, lo que incrementa la probabilidad de fusión de las vesículas (Parnas y Parnas 1982), aumentando la liberación del neurotransmisor. Así cuando se mandan trenes de estímulos a intervalos cortos de tiempo se observa ya sea un progresivo incremento en FPP, o bien, un decremento en la amplitud de las respuestas sinápticas depresión por pulso pareado (DPP) (Zucker, 1999).

Protocolo experimental.

En la mayor parte de los experimentos, se aplicaron dos estímulos de igual intensidad con el fin de determinar la FPP. La cual se evaluó como el cociente entre la amplitud de la respuesta ortodrómica al segundo estímulo (S_2) entre la respuesta al primer estímulo (S_1):

$$PPF = \frac{S_2}{S_1} \dots\dots\dots(1)$$

Que expresado en porcentaje queda:

$$PPF = \left(\frac{S_2}{S_1} - 1 \right) \cdot 100 \dots\dots\dots(2)$$

Durante el control, la intensidad de los estímulos se ajusto para ver poca o ninguna FPP ($S_2/S_1=1$). Esto permitió detectar con facilidad los cambios provocados por la administración de los diferentes agonistas y antagonistas de los neuromoduladores. El intervalo interestímulo seleccionado osciló entre 40 a 250 ms. Los experimentos se realizaron en presencia de bicuculina (10 μ M) con el fin de eliminar el componente inhibitorio GABA_A (Barral et al., 2000;2001).

La ecuación (1) también se utilizó de la siguiente manera: Siendo $S_1=$ %FPP en condiciones control, y $S_2=$ %FPP después de administrar los agonistas a los neuromoduladores utilizados.

Análisis de Datos.

La significancia estadística entre las muestras se determinó utilizando pruebas estadísticas paramétricas, *t* de Student para datos pareados, y estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney). Para ello se empleó el software comercial Minitab (State College, PA, USA) (Daniel, 2002; Brown y Rhothey, 1993).

La curva dosis respuesta fue ajustada con la ecuación:

$$y = E_{MIN} + \left[\frac{E_{MAX} - E_{MIN}}{1 + 10^{\log EC_{50} - C}} \right] \dots\dots\dots(3)$$

Donde E_{MAX} y E_{MIN} son los valores de las dosis máxima y mínima utilizadas, EC_{50} es el valor obtenido al 50 % del valor máximo (Prism Graphpad, Software Inc. San Diego, CA, U.S.A.).

Fármacos.

Los fármacos que se utilizaron en los experimentos del presente trabajo fueron, Bicuculina antagonista $GABA_A$ a una concentración de (10 μ M) (Sigma), 2OH-saclofen antagonista de $GABA_B$ (150 μ M) (Tocris), Baclofen agonista $GABA_B$ (1 μ M) (Sigma), así como 5-HT (1 μ M) (Sigma). Todos fueron preparados en soluciones stock y se agregaron al sistema de perfusión a las concentraciones antes mencionadas.

RESULTADOS.

El papel del Ca^{2+} en la liberación del neurotransmisor.

En primer término, se hizo necesario demostrar que la actividad eléctrica que se estaba registrando correspondía a potenciales sinápticos. Para ello, cualquier modificación en la entrada de Ca^{2+} a la neurona modifica la liberación del neurotransmisor en la terminal presináptica. En la figura 6 se muestra como diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular (0.5 – 4 mM) producen cambios en la amplitud de los potenciales sinápticos y en la facilitación por pulso pareado. En la misma figura se puede apreciar que el componente sináptico N_2 fue afectado por la menor entrada de iones a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje esto debido a la reducción de las concentraciones de Ca^{2+} , quedando demostrada de esta manera la hipótesis del calcio residual (Katz y Miledi, 1968.)

En nuestros resultados, la FPP (el cociente entre S_2/S_1) se incremento en $318 \pm 134 \%$, al pasar de 1.47 ± 0.05 en el control, a 6.15 ± 1.97 a bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular, cabe mencionar que la amplitud del primer sináptico (S_1) se reduce claramente en comparación con el segundo (S_2) ($n = 6$, $P < 0.05$, prueba de t de Student). Estos datos indican que el componente N_2 del potencial de campo registrado en la capa 2/3 de la corteza sensorio-motora de la rata es un componente sináptico, y que los cambios en la entrada de calcio extracelular modifican el cociente (S_2/S_1).

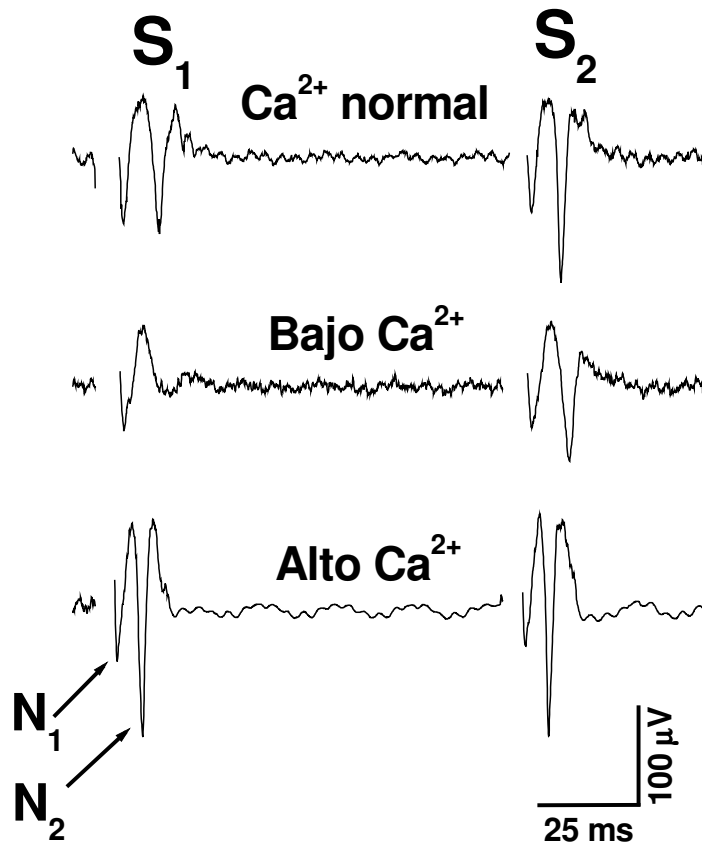


Figura 6: Observamos el protocolo (FPP), donde se administro a diferentes concentraciones Ca^{2+} extracelular, para demostrar la actividad sináptica. En condiciones de bajo Ca^{2+} (0.5 mM) se incrementa la FPP, mientras que en concentraciones de alto Ca^{2+} (4.0 mM) se produjo DPP (Depresión por pulso pareado).

La participación de la 5-HT en la liberación del neurotransmisor en la corteza.

En la figura 7 se muestran los trazos correspondientes al curso temporal del experimento en el que se tomo un control en presencia de Bicuculina (10 μ M) durante 10 min. Posteriormente se administro la 5-HT (1 μ M), en este periodo se produjo una reducción en la amplitud del potencial sináptico de $161.9 \pm 21.7 \mu$ V a $106.3 \pm 12 \mu$ V representando aproximadamente un 35% de disminución con respecto al control. Al mismo tiempo la relación de S_2/S_1 se incrementó de 1.10 ± 0.05 en condiciones control a 1.77 ± 0.17 en presencia de la 5-HT aumentando también la facilitación por pulso pareado en un $61 \pm 15 \%$ por arriba del control ($P < 0.01$, $n = 6$, *Prueba de t de Student* para datos pareados). Después de lavar la 5-HT, se agregó Cd^{2+} , bloqueador de canales de Ca^{2+} (25 μ M, $n=3$), durante 30 min. El efecto fue similar al observado cuando se aplico la 5-HT, es decir, también produjo una reducción en la amplitud del potencial sináptico originado en la misma población neuronal. Sin embargo, el cociente de S_2/S_1 se incremento en mayor proporción a la facilitación por pulso pareado producida por la 5-HT. Nótese que el componente N_1 no cambia ni en presencia de la 5-HT ni de Cd^{2+} . El único componente que se modifica es el N_2 , que corresponde al potencial sináptico. Por lo que estos experimentos muestran que la acción de la 5-HT ocurre sobre los componentes sinápticos al estimular la capa 5 y registrar en la capa 2/3 de la corteza sensorio-motora de la rata.

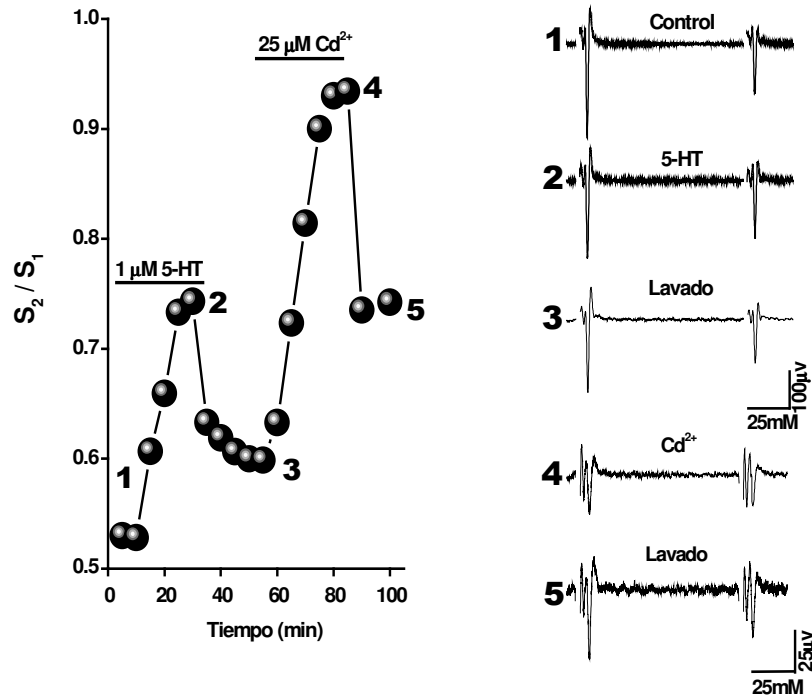


Figura 7: Se muestran los registros que se obtuvieron de un típico experimento, donde los números que se indican en la gráfica, corresponden a los trazos electrofisiológicos representados a la derecha de la gráfica. Al agregar la 5-HT (1 μM) se produjo una FPP de un $61 \pm 15\%$ por arriba del control ($P < 0.01$, $n = 6$, prueba de t), posteriormente al lavado se administro Cd^{2+} (25 μM), donde el cociente S_2/S_1 se incremento en mayor proporción a la FPP, producida por la 5-HT. Cabe mencionar que en los trazos 4 y 5 del protocolo, fueron reescalados para obtener una mejor imagen del registro.

La relación dosis-respuesta sobre el efecto dependiente de la concentración de la 5-HT.

Con la finalidad de conocer cual es la concentración efectiva de la 5-HT a utilizar a lo largo de este trabajo se obtuvo una curva dosis-respuesta, como se muestra en la figura 8. Se manejo un rango de concentraciones de 0.03 μM a 1 μM probando una sola concentración en cada rebanada, y promediando los efectos de al menos cuatro experimentos por cada concentración utilizada. De esta manera se observo que la 5-HT incrementa la relación S_2/S_1 de una dosis dependiente, calculando una EC_{50} de 2.36×10^{-7} mol/L. El efecto máximo se observo a la concentración de 1 μM , señalando que la 5-HT actúa principalmente a nivel presináptico en este rango de concentración (Zhou y Hablitz., 1999). Sin embargo, no se alcanzó la dosis saturante pues a concentraciones mayores a 1 μM (datos no mostrados), la acción de la 5-HT produjo efectos más variables, produciendo tanto FPP como DPP, probablemente por la incorporación del efecto a nivel postsináptico.

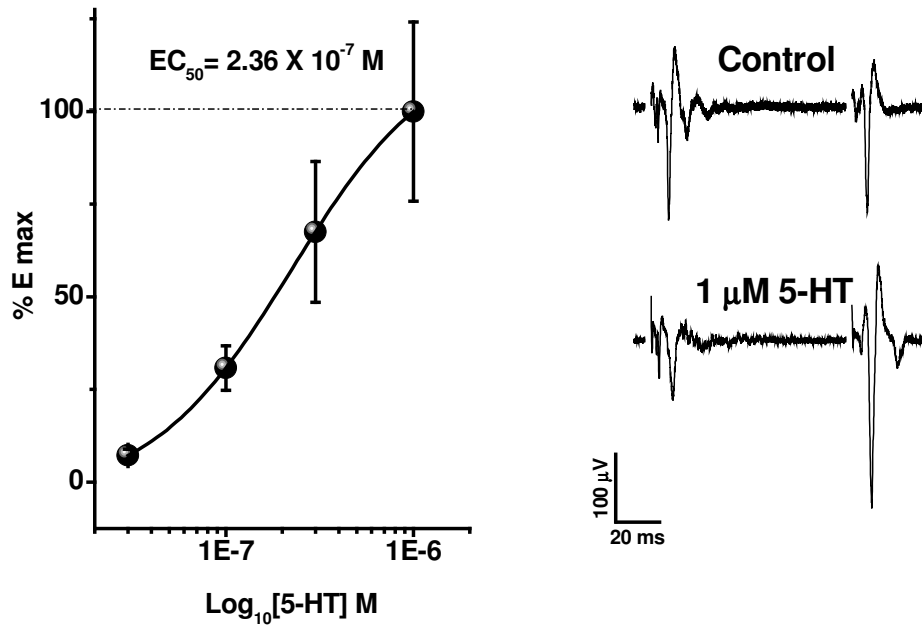


Figura 8: En esta gráfica se muestra la curva dosis-respuesta del efecto producido con respecto al cambio en la FPP, como un indicador del evento presináptico, donde el efecto máximo de la 5-HT fue de 1μM, la EC₅₀ observada fue de 2.36 x 10⁻⁷ mol/L. A la derecha se muestran los trazos del protocolo, donde se observa claramente la FPP producida por la 5-HT con respecto al control.

El papel de la 5-HT en la modulación presináptica en la corteza.

En la figura 9 se muestran los registros obtenidos en este experimento donde se aplicó por dos ocasiones la 5-HT (1 μ M) en un periodo de tiempo de 25 minutos durante cada prueba intercalados por el lavado (número 3 de la gráfica) todo fue en presencia de Bicuculina (10 μ M) antagonista del receptor GABA_A.

A lo largo del experimento se observó una disminución en la amplitud del registro S₁ y aumento en la relación S₂/S₁ indicando una inhibición presináptica donde la FPP no disminuyó después de repetidas ocasiones.

Por otro lado, el efecto de la modulación presináptica ocasionada por la 5-HT probablemente se debe a la participación de receptores subtipo de la 5-HT los cuales pueden encontrarse en las terminales de las células GABAérgicas.

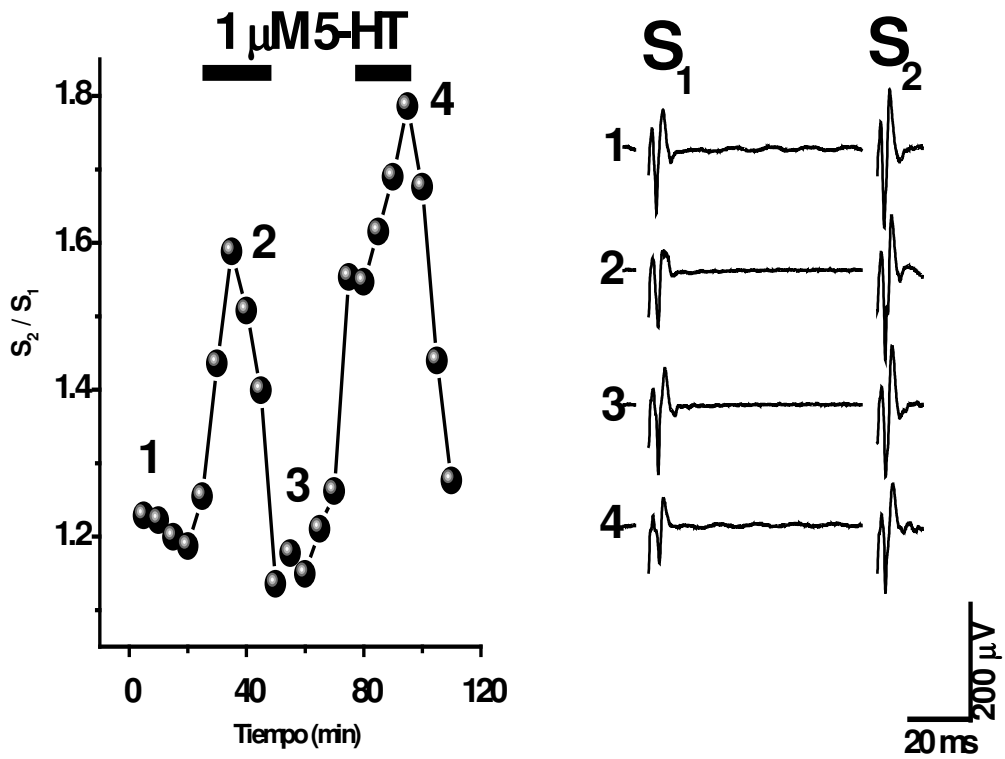


Figura 9: Se aprecia tanto en la gráfica como en los trazos del protocolo (derecha), la participación de la 5-HT (1 μ M) donde se aplicó en dos ocasiones, intercaladas por el lavado mostrando nuevamente una FPP en el protocolo.

El efecto de la 5-HT en la inhibición presináptica producida por la activación de los receptores GABA_B.

Para evaluar el efecto que produce la activación de receptores serotoninérgicos en presencia de agonistas y antagonistas del receptor GABA_B, se aplicó la 5-HT en presencia del agonista Baclofen (1 Mμ).

El protocolo experimental consistió en determinar en primera lugar el efecto de la 5-HT y posteriormente la interacción con el agonista. En este caso, la aplicación de la 5-HT (1 μM) produjo un incremento en la relación S₂/S₁, es decir se incrementó la FPP en un 90.0 ± 24.7 % (mediana = 126.0, n = 5, P < 0.05, Prueba de Mann-Whitney).

Después de retirar la 5-HT del baño de perfusión, se aplicó Baclofen (1 μM), en este caso el agonista GABAérgico incrementó la FPP al compararla con el control de (244.0 ± 131.0 %, mediana = 147.3, P < 0.05, prueba de Mann-Whitney), lo cual fue significativamente mayor a la obtenida por la 5-HT aplicada a la misma población neuronal. Notablemente, cuando se utilizó la 5-HT en presencia del Baclofen la relación S₂/S₁ que se había incrementado por la acción del agonista, se redujo casi completamente, este efecto fue claramente significativo (-39.1 ± 14.1 %, mediana = -39.4, n = 5, P < 0.01, prueba de Mann-Whitney), mostrando que el efecto de la 5-HT ocluye la inhibición presináptica producida por la activación de receptores GABA_B.

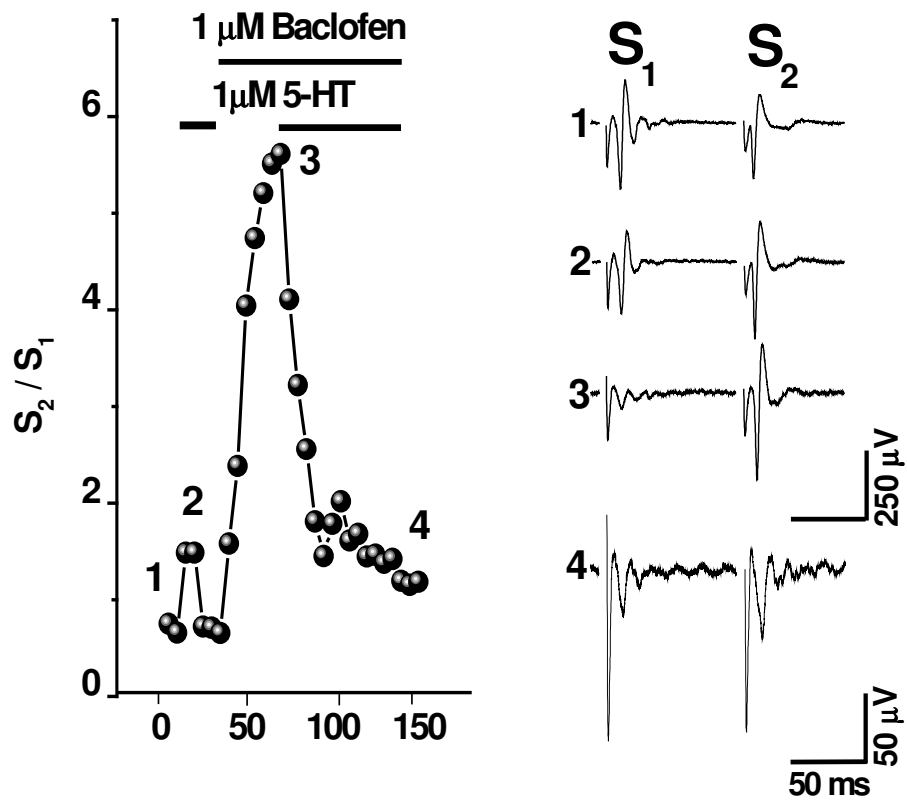


Figura 10: La aplicación del agonista Baclofen (1 μ M) y de la 5-HT (1 μ M) en el experimento mostró en ambos casos una FPP, aunque la producida por el agonista fue mayor en comparación a la que se produjo por la 5-HT. Sin embargo la relación S_2/S_1 que se había incrementado por la acción del Baclofen se redujo casi completamente al administrar la 5-HT en la misma solución (-39.1 ± 14.1 %, mediana = -39.4 , $n = 5$, $P < 0.01$, prueba de Mann-Whitney). A la derecha se muestran los trazos electrofisiológicos correspondientes a la gráfica.

El efecto del antagonista de los receptores GABA_B (2 OH-saclofen), sobre la FPP producida por la 5-HT.

Con el fin de confirmar la interacción de los receptores serotoninérgicos con los receptores GABA_B, se aplicó nuevamente la 5-HT (1 μM) en presencia del antagonista específico de receptores GABA_B, 2OH-saclofen (150 μM). Como se observa en la figura 11 la aplicación de la 5-HT previamente produce la inhibición presináptica similar a la descrita con anterioridad. Por otro lado, la aplicación de 2OH-saclofen no produjo cambios importantes en la relación S₂/S₁ (-22.0 ± 4.6 %, mediana = -23.52, n = 5, NS, prueba de Mann-Whitney) tal como se esperaba (Barral et al, 2000); al igual que cuando se aplicó la 5-HT en presencia de 2OH-saclofen (13 ± 22 %, mediana = 16.4, NS, prueba de Mann-Whitney). Tomados en su conjunto, el efecto de la 5-HT en presencia del agonista y del antagonista del receptor GABA_B, sugiere que probablemente la acción de esta amina sea indirecta sobre las neuronas GABAérgicas que a su vez pudieran estar actuando sobre las neuronas glutamatérgicas de la capa 2/3 de la corteza sensorio-motora de la rata.

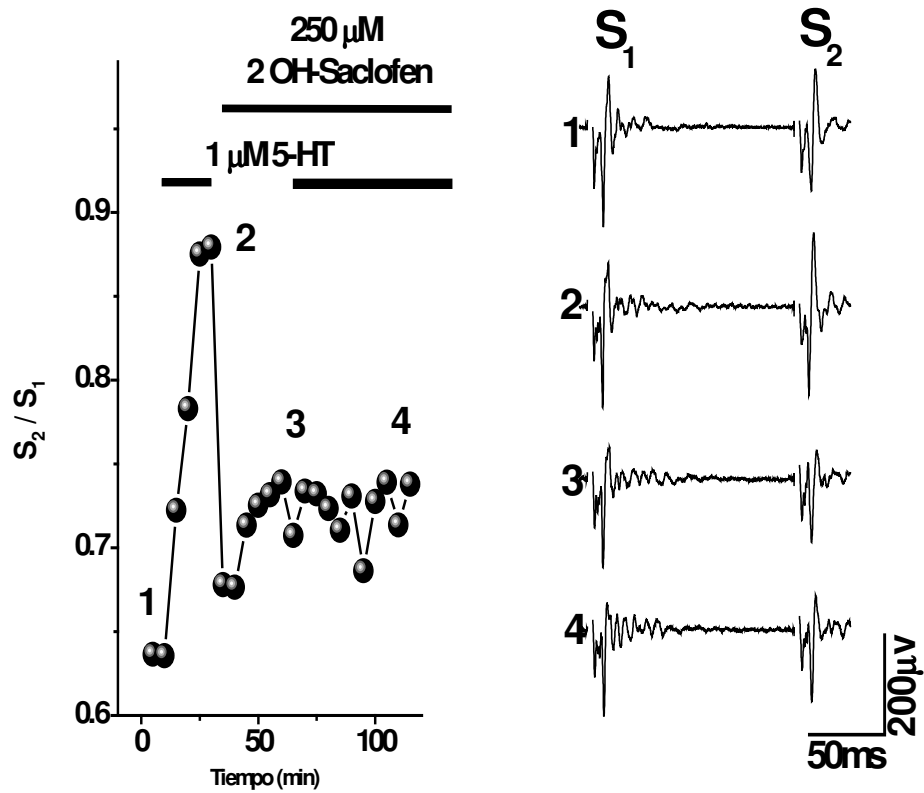


Figura 11: La influencia del antagonista 2OH Saclofen ($250 \mu\text{M}$) y de la 5-HT ($1 \mu\text{M}$) mostrada tanto en la gráfica como en los trazos de la derecha. Marcan una clara diferencia del efecto de ambos fármacos. De la misma forma que en el experimento anterior cuando se administró la 5-

HT, se produjo una FPP sin embargo en este caso no fue muy marcada. Por otro lado cuando se aplicó 2-OH saclofen no hubo cambios importantes en la relación S_2/S_1 (-22.0 ± 4.6 %, mediana = -23.52, n = 5, NS, prueba de Mann-Whitney), por último la aplicación de la 5-HT en presencia de 2-OH saclofen, fue ocluida posteriormente por el efecto del antagonista de GABA_B (13 ± 22 %, mediana = 16.4, NS, prueba de Mann-Whitney).

—

DISCUSIÓN.

La activación de los receptores presinápticos por una variedad de neurotransmisores y neuromoduladores pueden generar una inhibición presináptica la cual ayuda o sirve como medio de ajuste o regulación de una excesiva liberación del neurotransmisor en la sinapsis. Previa evidencias muestran que los moduladores presinápticos inhiben la entrada de corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje activando conductancias de K^+ (López y Brown, 1992; Wu y Saggau, 1997).

Otros estudios han afirmado la posible participación de los receptores de la 5-HT en la modulación presináptica de la corteza (Föehring, et al 2002). Ya que se ha demostrado que reduce corrientes de Ca^{2+} , deprimiendo la transmisión sináptica excitatoria, es decir actúa inhibiendo la transmisión glutamatérgica en moto neuronas de rata por un mecanismo presináptico (Schmitz, et al 1998). El efecto de la 5-HT puede estar relacionado con una modulación indirecta por una vía de activación a proteínas G y segundos mensajeros, que a su vez compiten o interactúan en el sitio de acción con otra clase de receptores.

En este caso con los receptores GABA_B que se localizan en los cuerpos de las interneuronas inhibitoras de la corteza cerebral, las cuales establecen sinapsis sobre neuronas piramidales. Por lo tanto pueden ejercer una influencia inhibitora directa sobre la génesis de los potenciales de acción en el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales (Krnjevic, 1997; Rodney y Kevan, 1998).

Se han reportado observaciones similares en otras áreas cerebrales, sugiriendo que la activación de receptores GABA_B producen inhibición presináptica (Barral, et al., 2000; Murakoshi, et al., 2001).

Por tal motivo la importancia de este trabajo se centra en la evaluación y correspondencia de los receptores serotoninérgicos y GABAérgicos en particular la modulación presináptica producida por la activación de receptores serotoninérgicos en la sinapsis de la capa 2/3 de la corteza sensorio-motora, después de haber estimulado la capa 5.

Los resultados muestran que la inhibición presináptica producida por la 5-HT es dependiente de la concentración utilizada, con una EC₅₀ de 2.36×10^{-7} mol/L. Además cabe mencionar que sucesivas aplicaciones de la 5-HT en el mismo experimento no modifican la FPP. Sin embargo, para la construcción de la curva dosis-respuesta, se utilizó una rebanada para cada concentración probada (n = 6, para cada punto). Hasta donde sabemos no se han realizado curvas dosis-respuesta de serotonina utilizando como indicador un aspecto funcional como lo es el protocolo de pulsos pareados. La variabilidad observada no es sorprendente ya que tanto las neuronas de la capa 2/3 como las interneuronas presentan respuestas variables a la 5-HT (Föehring, et al., 2002; Zhou y Hablitz., 1999). A concentraciones mayores a 1 μM (datos no mostrados) encontramos depresión por pulso pareado, posiblemente por la activación de diferentes tipos de receptores serotoninérgicos, tanto pre-como postsinápticos, tal es el caso del receptor 5HT_{2A} (Föehring, et al., 2002).

Del mismo modo como puede observarse en los resultados obtenidos en este trabajo, se ha reportado que el receptor GABA_B se activa con la presencia

del Baclofen dando como resultado, a nivel presináptico, una disminución de la corriente de Ca^{2+} (Bowery, 1993) que puede interpretarse como una fuerte influencia inhibitoria en la sinápsis cortical, la cual se refleja como un incremento en la relación S_2/S_1 .

La inhibición presináptica producida por Baclofen fue mayor a la observada por la 5-HT a las mismas concentraciones y aplicadas a la misma población neuronal. Esto pudiera deberse a que existe un menor número de receptores serotoninérgicos que GABAérgicos ya que la región de la corteza en los mamíferos, posee una enorme población de interneuronas de las cuales casi el 97% son GABAérgicas (Krnjevic, 1997). Sin embargo, la inhibición presináptica producida por la activación de receptores $GABA_B$, fue revertida por la aplicación de la 5HT en presencia del agonista de $GABA_B$. Una posible explicación es el hecho de que tanto los receptores de la 5-HT como el receptor $GABA_B$, activan la misma cadena de señalización intracelular a través de una proteína $G_{i/o}$ sensible a la toxina Pertussis (Odagaki y Fuxe, 1995) y ambos receptores inducen la activación de canales de potasio rectificadores anómalos a través de una vía delimitada a membrana. Por lo que es posible que el mecanismo por el cual la 5-HT y el GABA que producen inhibición presináptica sea común para ambos receptores (Jeong, et al., 2001).

Otra posible explicación del efecto de la 5-HT sobre los receptores $GABA_B$ consiste en suponer que la acción de la 5-HT actúa sobre las sinapsis que se establecen entre las interneuronas GABAérgicas y que modulan a las neuronas glutamatérgicas. De tal modo que cuando se produce la activación de receptores $GABA_B$ por el Baclofen, se inhibe la liberación de glutamato en las sinapsis de la capa 2/3, pero cuando se aplica la 5-HT se ocluye el efecto del

agonista GABAérgico, probablemente porque la 5-HT inhibe la liberación de GABA. Finalmente el bloqueo de los receptores GABA_B, en presencia del antagonista 2-OH saclofen, no muestra efecto alguno, aun cuando se agrega la 5-HT en presencia del antagonista, probablemente porque todos los receptores de GABA están bloqueados y aunque la 5-HT siga teniendo efecto, este no se observa.

CONCLUSIONES.

- La inhibición presináptica producida por la activación de la 5-HT fue dependiente de la concentración utilizada.
- La activación de los receptores GABAérgicos del tipo GABA_B por medio de su agonista Baclofen (1μM), produjeron una inhibición presináptica mayor que la producida por la 5-HT. Sin embargo este efecto se revirtió cuando se agregó la 5-HT en presencia del agonista.
- En el caso del antagonista (2-OH saclofen), se encontró que la FPP producida por la 5-HT, fue revertida.
- La modulación presináptica producida por la 5-HT sirve como un mecanismo de ajuste para prevenir una excesiva liberación del neurotransmisor en la terminal sináptica.
- Los resultados sugieren que la 5-HT actúa modulando la activación de los receptores GABA_B, ya que interactúa y compite por un sitio de acción en la inhibición presináptica producida en la corteza sensorio-motora de la rata.
- En conjunto los datos obtenidos en este trabajo nos llevan a concluir lo importante que es el empleo del protocolo farmacológico, para poder estudiar los procesos de síntesis, modulación y liberación de neurotransmisores.

REFERENCIAS:

- Amin AH, Crawford TBB (1954) The distribution of substance P and 5-HT in the central nervous system of the dog. *J. Physiol* 126: 596-618.
- Andreasen MS, Hablitz JJ. (1995) Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: A patch-clamp study in rat hippocampus in vitro. *J. Neurosci.* 72: 326-336.
- Arbib, M., P. Érdi y J. Szentágothai (1998) Neural Organization, structure function y dynamics. MIT Press. Cambridge. pp 205-260.
- Bargas J, Ayala GX, Hernández E, Galarraga E (1998) Ca channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res. Bull.* 45: 521-524.
- Barral, J. (2001). Modulación Preináptica de las aferentes excitatorias Glutamatergicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. UNAM. FES. Iztacala. México de D.F. Pp. 82.
- Barral J, Toro S, Galarraga E, Bargas J. (2000) GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Neurosc. Letters.* 283: 33-36.
- Baumgarten HG, Göthert M (1999) Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Berlin, Alemania. Ed. Springer. Pp. 500-535.
- Bennett-Clarke CA, Lane RD (1995) Fenfluramine depletes serotonin from the developing cortex and alters thalamocortical organization. *Brain Res.* 702 (1-2):255-260.
- Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, Schuler V, Shigemoto R, Kaupmann K, Bettler B, (1999) Spatial distribution of GABAB R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J. Comparative Neurology* 412: 1-16.
- Bortolozzi A, Amargós-Bosh M, Adell A, Díaz-Mataix LI, Serrats J, Pons S, Artigas F (2003). In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT_{2A} receptors: effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci* 18: 1235-1246.
- Bowery N (1993). GABA_B receptor pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 33: 109-147.
- Brown D y Rothery P (1993) Models in biology: Mathematics, statistics and computing. Wiley & Sons. NY. pp. 199-290.
- Charlton MP, Smith SJ, Zucker RS. (1982). Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse. *J. Physiol.* 323: 173-193.

- Cordingley GE, Weight FF. (1986) Non-cholinergic synaptic excitation in neostriatum: pharmacological evidence for mediation by glutamate-like transmitter. *Br. J. Pharmacol* 88: 847-856.
- Daniel W (2002) *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ª Ed. Limusa Wyley México Pp. 925.
- Debanne, D. M.C. Guérineau, B.H. Gähwiler y S.M. Thompson (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release *J. Physiol. Lond.* 491:163-176.
- Flores-Hernandez J, Galarraga E, Bargas J. (1997) Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse.* 25: 185-195.
- Foehring RC, van Brederode JFM, Kinney GA, Spain WJ. (2002) Serotonergic modulation of supragranular neurons in rat sensorimotor cortex. *J. Neuroscience.* 22(18): 8238-8250.
- Gage PW. (1992) Activation and modulation of neuronal k⁺ channels by GABA. *TINS* 15: 46-51.
- Goodman, Gilman (1997). *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México: Mc Graw-Hill, Interamericana Pp. 265-279.
- Grimaldi B, Fillion G. (2000) 5-HT-moduline controls serotonin activity: implication in neuroimmune reciprocal regulation mechanisms. *P. Neurobiology.* 60: 1-12.
- Hammond, C. (2000). *Cellular and molecular neurobiology*. N. Y.: Ed. Academic Press. pp. 188-214.
- Hammond, C. (2001). *Cellular and molecular neurobiology*. N. Y.: Ed. Academic Press. Pp. 491.
- Hernández-Echegaray E, (1998) *La modulación colinérgica de las aferentes glutamatérgicas del estriado*. Tesis de Doctorad. UNAM-UACPyP. México. Pp.5.
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer. pp. 201-236.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin G R (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 71: 533-554.
- Jeong HJ, Han SH, Min BI, Cho YW, 2001. 5-HT_{1A} receptor-mediated activation of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacol.* 41, 175-185.

- John N. (2001). The human brain, (An introduction to its functional anatomy). ed. 5a. E.U. Ed. Mosby. Pp. 495.
- Johnston, D. y Wu, S.M. (1995) Foundations of cellular neurobiology. MIT Press. Cambridge. Mass. pp 287-391.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of Neural Science. USA: McGraw-Hill. pp. 175-298.
- Katz, B. (1966) Nerve, muscle and synapsis. McGraw-Hill. N.Y. pp.97-110.
- Katz, B. y Miledi, R. (1967a) The release of acetylcholine from nerve endings by graded electrical pulses. Proc. R. Soc. Lond. B. 167: 23-38.
- Katz, B. y R. Miledi (1967b) The timing of calcium action during neuromuscular transmission. J. Physiol. (London) 203:459-487.
- Katz, b. y R. Miledi (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. J. Physiol. 195:481-492.
- Katz, B. (1969) The release of neural transmitter substances. Springfield. IL Thomas. Pp 1.
- Katz, B. y R. Miledi (1970) Further study of the role of calcium in synaptic transmission. J. Physiol. (London) 207: 789-801
- Krnjevic, K. (1997) Role of GABA in cerebral cortex. Can. J. Physiol Pharmacol. 75: 439-451.
- Koyama S, Kubo C, Rhee JS, Akaike N. (1999) Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons. J. Physiology 518.2: 525-538.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2002). Biología Celular y Molecular. México: Ed. Medica Panamericana. P. 1084.
- López HS, Brown. (1992). Neuromodulation. Curr. Opin. Neurobiol. 2: 317-322.
- Lovinger DM, Merritt A, Reyes D. (1994) Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. Neuroscience. 62: 31-40.
- Malenka RC, Kocsis JD (1998) Presynaptic actions of carbachol and Adenosine on corticoestriatal synaptic transmission studied in vitro. J. Neuroscience. 8:3750-3756.

- Marek GJ, Aghajanian GK. (1998) 5-hydroxytryptamine-induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by μ -opiate receptor activation. *Neuroscience* 86: 485-497.
- Miller RJ (1998). Presynaptic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 201-227.
- Murakoshi T, Song S, Konishi S, Tanabe T (2001). Múltiple G-protein-coupled receptors mediate presynaptic inhibition at single excitatory synapses in rat visual cortex. *Neurosci Lett* 309:117-120.
- Mountcastle VB (1998) *Perceptual Neuroscience: The Cerebral Cortex* Harvard University Press. pp. 50-77.
- Nicoll RA (1998) The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* 241:545-551.
- Odagaki Y, Fuxe K (1995) 5-HT, GABA_B and pirenzepine-insensitive muscarinic receptors are functionally coupled to distinct pools of the same kind of G-proteins in rat hippocampus. *Brain Res.* 14; 689 (1): 129-135.
- Parnas HJD, Parnas I (1982) Neurotransmitter release and its facilitation in crayfish, saturation kinetics of release and of entry and removal calcium. *Pflügers Arch.* 393:1-14.
- Rodney D y Kevan M (1998) Neocortex. En: Shepherd GM, (Ed) *The synaptic organization of the brain*. New York. Ed. Oxford University press. pp. 459-509.
- Salín P. (1997) *Bases Bioquímicas y Farmacológicas de la Neuropsiquiatría*. México: Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 49 – 66.
- Schmitz D, Gloveli T, Empson RM, Draguhn A, Heinemann U (1998) Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. *J. Physiol.* 508.1: 119-129.
- Schmitz D, Gloveli T, Empson RM, Heinemann U. (1999). Potent depression of stimulus evoked field potential responses in the medial entorhinal cortex by serotonin. *Br. J. Pharmacology.* 128: 248-254.
- Simon AM, Goudenough DA. (1998) Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in Cell Biology.* 8: 477- 483.
- Sodickson DL, Bean BP. (1996). GABA_B receptor activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.* 16: 6374-6385.
- Spain WJ. (1994) Serotonin has different effects on two classes of Betz cells from the cat. *J. Neurophysiol.* 72: 1925-1937.

- Suzdak PD, Foged C, Andersen KE (1994) Quantitative autoradiographic characterization of the binding of [^3H] tiagabine (NNC 05-328) to the GABA uptake carrier. *B. Research* 647: 231-241.
- Tao R, Ma Z, Auerbach SB (1996) Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABA_A and GABA_B receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *J. Pharmacology* 119: 1375-1384.
- Thomson AM, Bannister AP (2003) Interlaminar connections in the neocortex. *C. Cortex* 13: 5-14.
- Tanaka E, North RA (1993) Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J. Neurophysiol.* 69: 1749-1757.
- Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M. (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-Hydroxytryptamine neurons. *Neuroscience* 106: 783-792.
- Wang J, McFadden SL, Caspary D, Salvi R. (2002) Gamma-aminobutyric acid circuits shape response properties of auditory cortex neurons. *Brain Research.* 944: 219-231.
- Williams GV, Rao SG, Goldman-Rakic P. (2002) The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. *J. Neurosci.* 22: 2843-2854.
- Wu LG, Saggau P. (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *TINS* 20 (5): 204-212.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 82: 2989–2999.
- Zimmerman, H. (1993) Synaptic transmission, cellular and molecular basis. Oxford University Press. N.Y. pp 111-117.
- Zucker RS. (1999) Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19: 305-313.

