

# **Universidad Nacional Autónoma de México**

## **Facultad de Estudios Profesionales Iztacala**

**Caracterización electrofisiológica y modulación del patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga por la activación de receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2.**

### **TESIS**

Que para obtener el título de

### **Bióloga**

Presenta:

**Zinaeli López González**

No Cuenta: **09715192-4**

Generación: **2000-2003**

Domicilio: **Monte Ararat no 26, Parque Residencial Coacalco, Coacalco Edo. de Méx. C.P 55720**

Tel: **5865.63.56**

**Vo Bo Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero  
Director de Tesis**

Los Reyes Iztacala, a 12 de Marzo de 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Para la realización del presente trabajo se conto con un apoyo del **Programa de Becas para Tesis de Licenciatura (PROBETEL-FES IZTACALA)**.

El presente trabajo fue realizado con recursos aportados por el **Programa de Apoyo a 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**) y a la Dra. Elvira Galarraga (**IN202100**).

El trabajo experimental se realizo en el laboratorio **BL-101 del Instituto de Fisiología Celular** (Dra. Elvira Galarraga), y el análisis de los datos 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 Agosto de 2003 a Marzo de 2004.

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

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres, Elizabeth González Robledo y Omar López Luna. A ti mami por tu apoyo y comprensión y a ti papi por todo lo maravilloso que me dejaste, porque gracias a ti estoy donde estoy.  
Con todo mi amor y respeto.

# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime Barral y a la Dra. Elvira Galárraga por su valiosa asesoría y apoyo para la realización de este trabajo.

A mis sinodales el Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz, la Dra. Bertha Segura Alegría y el Biol. Hugo Jesús Castro Cortés por sus consejos y observaciones.

A Beto por su colaboración en la parte anatómica de este proyecto.

Al Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala, en particular a los profesores Beatriz Rubio y Enrique Godínez, que se encargaron de mantener a la población de tortugas que se utilizaron para la realización del presente trabajo

A las personas de laboratorio que me echaron la mano en algunos detalles de la tesis.

A mis padres y todos mis hermanos por su apoyo y comprensión

A mis amigos, especialmente a ti Brenda por escuchar siempre mis patoaventuras en el laboratorio.

A ti Miguelito por tu compañía, apoyo y por saber escucharme.

Y a mi padre **Dios** porque solo él me ha dado la fortaleza para llegar hasta aquí.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Organización estructural y funcional de los ganglios basales en amniotas.....	6
Evolución de los Ganglios Basales.....	9
Organización funcional y estructural del estriado.....	13
El Sistema Dopaminérgico.....	19
Receptores Dopaminérgicos.....	22
<i>Caracterización funcional de la familia D1</i> .....	27
<i>Caracterización funcional de la familia D2</i> .....	29
Distribución de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en amniotas.....	31
<i>Distribución anatomica en los ganglios basales</i> .....	31
<i>Distribución celular</i> .....	34
ANTECEDENTES.....	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
OBJETIVOS.....	40
METODOLOGÍA.....	41
Reptiles.....	41
Disección del cerebro de rata.....	43
Disección del cerebro de tortuga.....	43
Sistema de Registro Intracelular.....	44
Caracterización electrofisiológica.....	45
Morfología de las neuronas estriatales.....	47
Fármacos.....	48
Análisis de datos.....	48
RESULTADOS.....	49
Caracterización electrofisiológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga.....	49
Caracterización morfológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga.....	54
Modulación en la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2.....	59
Modulación de la meseta de calcio en las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2.....	62
DISCUSION .....	64
Caracterización electrofisiológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga.....	64
Caracterización morfológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga.....	67
Modulación en la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2.....	68
Modulación de la meseta de calcio en las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2.....	69
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73



## RESUMEN

Estudios bioquímicos, anatómicos y genéticos han revelado que los ganglios basales de los vertebrados tetrápodos tienen patrones comunes de organización, sugiriendo esto, que se han conservado fuertemente a lo largo de la evolución. Uno de los núcleos de los ganglios basales (GB) mejor estudiados del sistema nervioso de los mamíferos es el cuerpo estriado, principal núcleo de entrada de información a los GB e involucrado en el control motor de los vertebrados. La inervación dopaminérgica de los componentes ventrales y dorsales del estriado es una de las características más conservadas de los GB de los tetrápodos, cualquier cambio en la entrada dopaminérgica modifica el comportamiento motor en todos los tetrápodos. El establecimiento de las diferencias y las similitudes de la modulación dopaminérgica así como de las propiedades electrofisiológicas de las principales neuronas del estriado (neuronas espinosas medianas, NEM's), entre mamíferos y reptiles permitiría comprender, entre otras cosas, la forma en que las funciones motoras estriatales pudieran haber evolucionado, es por ello que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar electrofisiológica y anatómicamente a las NEM's del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga, así como estudiar el efecto modulador de la dopamina sobre la excitabilidad y la meseta de calcio a través de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2, sobre estas neuronas. Para ello se obtuvieron registros intracelulares en la modalidad de fijación de corriente en rebanadas de 350 – 400  $\mu\text{m}$  del Neostriado de mamífero (rata cepa Wistar Kyoto) y de reptil (tortugas, *Kinosternum irtipes*), con microelectrodos de 70 – 130  $\text{M}\Omega$  de resistencia, (acetato de potasio (3 M) y biocitina (1 – 2 %) como conductor). Las neuronas se identificaron morfológicamente con la técnica biocitina-avidina-biotina (ABC) conjugado con peroxidasa de rábano. Los protocolos electrofisiológicos que se realizaron fueron de curvas intensidad – voltaje, intensidad – frecuencia y pulso corto. Los agonistas dopaminérgicos utilizados fueron para el D1 6 CIPB 2  $\mu\text{M}$  y para el D2 Quinelorane 10  $\mu\text{M}$ , los cuales fueron añadidos al medio de perfusión por separado. Los parámetros electrofisiológicos de las NEM's del *Paleostriatum augmentatum* de reptiles y del neostriado de mamíferos fueron muy similares; las NEM's de tortuga, presentaron un potencial de membrana de  $-63.13 \pm 2.07$  mV, un umbral de disparo de  $-32.54 \pm 1.55$ , así como una fuerte rectificación a potenciales hiperpolarizantes (-80 mV), y un retardo del primer potencial de acción después de haber iniciado la despolarización de  $336.53 \pm 30.18$  ms. Con respecto a la morfología, el soma de las NEM's de tortuga fue ligeramente menor que las el de las NEM's de rata. ( $12.8 \pm 1.49$  vs  $17.6 \pm 0.68$ ), el árbol dendrítico tuvo una extensión mayor ( $406.67 \pm 58.93$  vs  $364 \pm 12.42$ ) presentando una menor densidad de espinas. El receptor dopaminérgico D1 aumentó la frecuencia de disparo de la en la NEM's de tortuga un  $23.81 \pm 3.69$  % ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ,  $t$  de Student), mientras que la activación del receptor D2 la disminuyó en un  $29.94 \pm 4.41$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ,  $t$  de Student). Esta modulación muy probablemente involucra las conductancias de calcio tipo L, al igual que en mamíferos, pues el agonista D1 aumentó la meseta de calcio de la NEM con respecto al control, contrario al efecto provocado por el agonista D2, ya que éste último la disminuyó. Los resultados electrofisiológicos arrojados por este trabajo nos permiten soportar la idea de que la inervación dopaminérgica modula las funciones motoras por activación de los receptores D1 y D2 de la misma forma en todos los amniotas y que los ganglios basales de dichos organismos no sólo han conservado fuertemente la integridad del circuito sináptico, sino también los diferentes aspectos funcionales de los mismos.

# INTRODUCCIÓN

Hace unos 200 millones de años un grupo de los primeros anfibios, posiblemente los antracosaurios, dieron origen a los primeros reptiles. El origen de los reptiles marcó la emergencia de los vertebrados terrestres, un evento hecho posible gracias a la evolución del huevo aminiótico, el cual eliminó la etapa larval acuática. Casi inmediatamente después de su origen, los reptiles se dividieron en dos principales grupos: a) los sauropsidos, de los cuales surgen los principales grupos de reptiles y las aves; y b) los terápsidos, de los cuáles surgieron una serie de organismos intermediarios, ahora extintos, de los modernos mamíferos (Northcutt, 1981).

La transición del medio ambiente acuático al medio ambiente terrestre implicó grandes cambios en la organización estructural y funcional de los organismos, particularmente del sistema nervioso (Northcutt, 1981). De esta manera, los reptiles ocupan un lugar crucial en la evolución de los tetrápodos, pues las estructuras nerviosas del cerebro de los mamíferos actuales se originaron a partir de ancestros reptiles. Los estudios a nivel del sistema nervioso desde un punto de vista filogenético son de gran importancia, ya que nos permiten ver la manera en que las estructuras nerviosas, tanto en función como en organización, pudieron haber evolucionado.

Un lugar muy importante dentro de los estudios a nivel del sistema nervioso central de los tetrápodos lo ocupan un conjunto de núcleos conocidos como

ganglios basales. Los ganglios basales (GB) son estructuras subcorticales altamente interconectadas entre si que juegan un papel muy importante en las funciones motoras, particularmente en la iniciación, planeación y ejecución de los movimientos (Albin et al, 1989), también se ha aceptado que están relacionadas con funciones no motoras como conductas incentivas y de motivación (Redgrave et al, 1999).

El origen de los GB se remonta a peces agnatos, sin embargo, durante la transición evolutiva de anfibios a reptiles ocurre un gran cambio estructural en estos núcleos, que podría explicarse por los cambios conductuales y adaptativos que debieron ocurrir al dejar un medio ambiente acuático y colonizar el medio ambiente terrestre, con las consecuentes adaptaciones de los tetrápodos terrestres a la locomoción (Northcutt, 1981; Striedter, 1997; Pough et al, 1999).

Uno de los núcleos de los ganglios basales mejor estudiados del sistema nervioso de los mamíferos es el cuerpo estriado, se trata del principal núcleo de entrada de información a los GB, que recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo y dopaminérgicas de las neuronas del complejo área tegmental ventral (VTA)-Susbtancia nigra pars compacta (SNc); (Smeets et al, 1999). La mayor parte de las neuronas del estriado son neuronas de proyección, es decir, sus axones salen de este núcleo y establecen sinapsis fuera de él, estas células reciben el nombre de neuronas espinosas medianas (NEM's) y su neurotransmisor principal es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico, GABA (Wilson, 1998).

La inervación dopaminérgica de los componentes ventrales y dorsales del estriado es una de las características más conservadas de los GB de los tetrápodos, sin embargo la diferencia esencial entre amniotas (aves, reptiles y mamíferos) y anamniotas (peces y anfibios) es la localización y desarrollo del grupo de células dopaminérgicas. La entrada dopaminérgica al estriado parece desempeñar un papel similar en todos los tetrápodos, cualquier cambio en la entrada dopaminérgica modifica el comportamiento motor en todos los tetrápodos, lo que sugiere que la dopamina tiene un efecto fundamental sobre la función estriatal. Sin embargo no parece quedar claro en que momento de la evolución o de que manera surge la interacción entre este sistema dopaminérgico y otros circuitos neuronales de gran importancia para el control motor, como el colinérgico (Smeets et al, 1999).

El papel modulador de la dopamina esta determinado por su familia de receptores y su función en los ganglios basales es de suma importancia, ya que las alteraciones en su papel regulador resultan en diferentes desórdenes psicomotores. Es por este hecho, que el estudio de la actividad fisiológica ejercida por los diferentes receptores existentes para esta catecolamina, constituye el tema de trabajo de un gran número de laboratorios en el mundo (Pérez-Garci, 2003; Galarraga et al, 1994).

El estudio comparativo de los ganglios basales es de gran importancia ya que ha revelado varias características que pueden ser de gran interés para

comprender mejor el funcionamiento o disfunción de estas estructuras, sin embargo todos estos estudios son altamente especulativos cuando sólo integran datos anatómicos (Reiner et al, 1998). En ese sentido, aunque se conoce que conexiones neuronales como las dopaminérgicas, de gran importancia en este núcleo e involucradas en el control motor, así como los neurotransmisores y neuromoduladores implicados en este circuito están presentes en amniotas y anamniotas (Reiner et al, 1998); se ha sugerido que el origen de ésta población de neuronas es la misma en estos dos grupos de vertebrados (Marín et al, 1998); sin embargo, se desconoce si este circuito ha cambiado funcionalmente a través de la evolución.

Electrofisiológicamente se ha reportado que el circuito dopaminérgico estriatal así como las características electrofisiológicas del principal grupo de neuronas de este núcleo (neuronas espinosas medianas) están conservadas tanto en aves como en mamíferos (Ding y Perkel, 2002). En reptiles, principalmente en tortugas, existen numerosos reportes que incorporan registros electrofisiológicos, realizados en diferentes núcleos del sistema nervioso: corteza cerebral (Shen y Kriegstein 1986; Blanton et al, 1989,1990 y 1991), cerebelo (Gabbiani et al, 1994), sistema visual (Vitanova et al, 2001; Bartol et al, 2002 y Louis et al, 2002), núcleo rojo (Keifer et al, 1992), tallo cerebral (Kiehn et al, 1992), médula espinal (Delgado-Lezama et al, 1999; Hounsgaard, 2002; McDonagh et al, 1999; Perrier y Hounsgaard, 1999 a,b; Guertin y Hounsgaard, 1998; Guertin y Hounsgaard, 1999; Henselmans et al, 1991); sin embargo, no se han reportado registros electrofisiológicos de los ganglios basales de reptiles que arrojen información

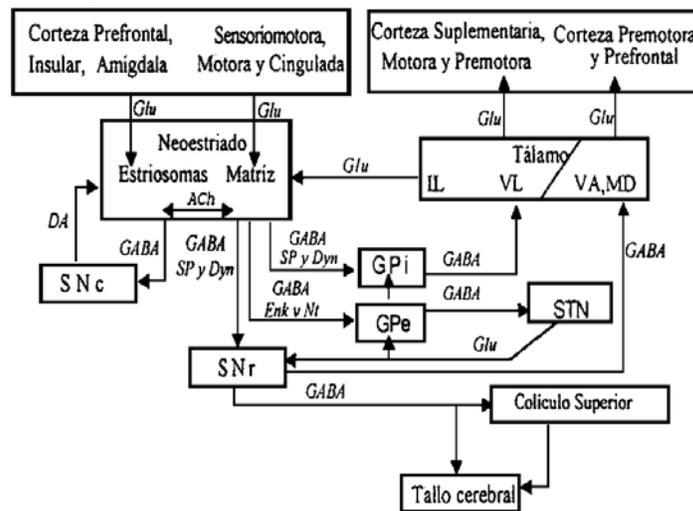
acerca del funcionamiento de este circuito neuronal tan importante para el control motor, por ello el presente trabajo tiene por objeto mostrar por primera vez la caracterización electrofisiológica y morfológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga, así como mostrar la modulación funcional del circuito dopaminérgico sobre estas neuronas.

## Organización estructural y funcional de los ganglios basales en amniotas

Los ganglios basales (GB) están organizados en dos sistemas principales: A) el *sistema dorsal estriatopalidal*, que consta del estriado dorsal (núcleos caudado y putamen en primates) y pálido dorsal, el cual se divide a su vez en dos componentes, globo pálido externo (en primates) o simplemente globo pálido (en no primates) y en globo pálido interno (en primates) o núcleo entopeduncular (no primates); y B) el *sistema estriatopalidal ventral*, está constituido por el estriado ventral (núcleo accumbens y parte del tubérculo olfatorio) y el pálido ventral (Medina y Reiner, 1995,1997). La alteración de estos núcleos puede ocasionar diferentes desórdenes neurodegenerativos, como las enfermedades de Parkinson y de Huntington, debido a esta relevancia clínica han sido objeto numerosas investigaciones en las últimas décadas (Chesselet y Delfs, 1996).

En mamíferos y sauropsidos (aves y reptiles) los GB poseen una porción dorsal relacionada con las funciones sensoriomotoras, mientras que la porción ventral incluye al núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y pálido ventral, involucrados en las respuestas emotivas (Marín et al, 1998). En todos los amniotas, los GB están localizados en la porción central y/o ventral del telencéfalo debajo de la corteza o palium, y separada de ella por una lámina fibrosa libre de células (cuerpo calloso en los mamíferos, lámina medular dorsal en las aves); (Reiner et al, 1998). Estos núcleos reciben su entrada primaria desde la corteza

cerebral y envían su información hacia el cerebro medio, y vía tálamo, regresa a las cortezas prefrontal, premotora y motora. Así, las funciones motoras de los GB son por lo tanto mediadas, en gran parte, por las áreas motoras de la corteza frontal (Fig 1); (Kandel et al, 2000).



Figura

1.

**Compartimentalización de la entrada cortical hacia el núcleo estriado tal como se observa en los mamíferos actuales.** Las células de proyección de los estriosomas proyectan hacia la sustancia nigra pars compacta (SNc) y reciben aferentes de ella. Las neuronas espinosas medianas de la matriz proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y al globo pálido interno (Gpi) y externo (GPe). El Gpi proyecta hacia el tálamo ventral lateral, y este a su vez envía terminales a regiones motoras de la corteza. El Gpe mantiene proyecciones recíprocas con el núcleo subtalámico (STN), quien a su vez proyecta a la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior (VA) y dorsomedial (MD). Estos núcleos proyectan hacia las regiones límbicas de la corteza. Asimismo en el diagrama se muestran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías: Acetilcolina (ACh), dopamina (DA), dinorfina (Dyn), encefalinas (Enk), glutamato (Glu), ácido-gama-aminobutírico (GABA), neurotensina (Nt) y sustancia -P (SP). (Modificado de Barral, 2001).

La mayor parte de las aferencias que reciben los GB convergen en tres estructuras, bien caracterizadas en mamíferos: el núcleo caudado-putamen, el núcleo accumbens y el núcleo subtalámico, a continuación se describen estas estructuras:

A) *Núcleo caudado-putamen*: Estos núcleos comparten la misma organización celular, por lo que comúnmente son considerados como uno sólo: el estriado. Al estriado llegan las aferencias glutamatérgicas provenientes principalmente de la corteza cerebral, así como de los núcleos intralaminares del tálamo. La entrada de información cortical al estriado permite dividir a éste último en dos regiones, una sensorio-motora y una asociativa. La primera se localiza principalmente en el putamen y recibe proyecciones de la corteza motora. Por otro lado, la región asociativa, principalmente localizada en el caudado, recibe proyecciones de las cortezas frontales, parietales, temporales y occipitales (Flaherty y Graybiel, 1991).

B) *Núcleo accumbens*: Este núcleo comparte con el estriado la misma citoarquitectura; sin embargo, las vías glutamatérgicas que llegan a él provienen principalmente del hipocampo y de la corteza límbica; mientras que su entrada dopaminérgica proviene del área ventral tegmental (AVT). Los núcleos caudado, putamen y accumbens, considerados conjuntamente constituyen el neostriado (Wilson, 1998).

C) *Núcleo subtalámico*: Esta estructura es comúnmente considerada como el núcleo de relevo de la salida de información neostriatal, sin embargo también se

ha demostrado anatómicamente y fisiológicamente su conectividad con la corteza (en especial con las regiones motoras del lóbulo frontal) y el tálamo (Magill et al, 2000).

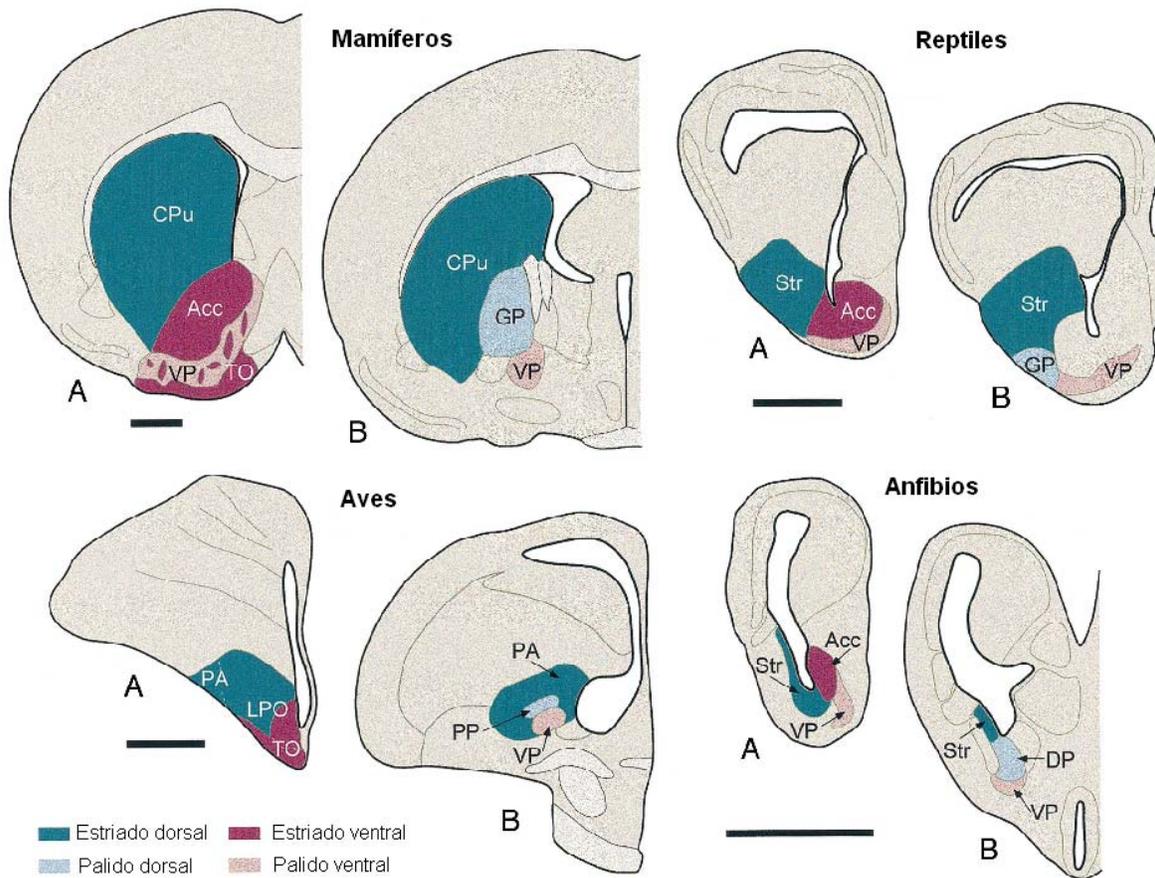
## **Evolución de los Ganglios Basales**

Los ganglios basales parecen tener una mayor elaboración durante la transición evolutiva de anfibios a reptiles, esta elaboración pudo haber permitido a los amniotas aprender y ejecutar un mayor repertorio de comportamientos y movimientos, habilidades que probablemente fueron un elemento importante para su exitosa adaptación al medio terrestre. Las subdivisiones estriatales y palidales están claramente presentes en los anamniotas (Fig. 2) y la mayor influencia de los ganglios basales sobre las funciones motoras de los anamniotas parece ser ejercida vía un circuito de salida hacia el tectum. Por el contrario, en los modernos amniotas las porciones estriatales y palidales de los ganglios basales (Fig. 2) contienen la misma población básica de neuronas, y el circuito funcional también parece ser muy similar en todos los amniotas, siendo su principal influencia sobre las funciones motoras por un circuito de salida hacia la corteza cerebral y tectum (Reiner et al, 1998).

Se piensa que la evolución de los GB en los mamíferos ha seguido una evolución divergente al patrón observado en las aves y reptiles, en estos últimos el estriado se hipertrofia mientras el primordio cortical permanece inalterado (Reiner et al, 1984). El patrón observado en mamíferos muestra que los ganglios basales permanecen relativamente sin cambios, sólo que el primordio cortical sufre una gran hipertrofia formando la típica neocorteza que rodea a los ganglios basales (Reiner et al, 1998). De esta manera, el telencéfalo de los sauropsidos (aves y reptiles) está dominado por los ganglios basales, mientras que el telencéfalo de

los mamíferos está dominado por la neocorteza (Reiner et al, 1984). En los mamíferos, el palium que cubre a los GB es la corteza de seis capas, mientras que en las aves y los reptiles este tejido palial es denominado cresta ventricular dorsal (DVR). Inicialmente se pensó que la DVR formaba parte de los GB, debido a las similitudes citoarquitectónicas; sin embargo, sobre la base de estudios embriológicos, anatómicos, histológicos y funcionales, se ha establecido que la DVR es más similar a la corteza de los mamíferos y es funcionalmente análoga (Reiner et al, 1984 y Reiner et al, 1983).

Por otro lado, se ha sugerido que la evolución de los ganglios basales se ha dado en diversas etapas a lo largo de la evolución de los vertebrados, ya que en los primeros vertebrados (presumiblemente los peces agnatos) los hemisferios cerebrales consistían solamente de componentes olfatorios, así, en los vertebrados más primitivos el precursor del cuerpo estriado recibía estímulos olfatorios, aferencia que va disminuyendo en importancia en los vertebrados más evolucionados y es insignificante en el hombre (Northcutt, 1981; Marin et al, 1998; Reiner et al, 1998); posteriormente la subdivisión palidal de los ganglios basales aparece durante la evolución de peces mandíbulados, seguida por la aparición de una subdivisión estriatal en el linaje de los anfibios. En los primeros reptiles (ahora extintos), se piensa que ocurrieron dos hechos importantes: a) el estriado alcanza ya proporciones relativas similares a las que se observan en los mamíferos y b) los precursores de la corteza aparecen en el techo de los hemisferios cerebrales (Reiner et al, 1984).



**Figura 2. Los ganglios basales están organizados en sistema estriatopalidal dorsal y ventral en todos los tetrápodos.** Para cada clase de vertebrados se muestran dos cortes coronales de cerebro representativos (A, rostral; B, caudal), que ilustran la posición relativa de las estructuras estriatales y palidales. Escala de la barra: 1mm. Abreviaciones: CPu (caudado-putamen), Acc (núcleo accumbens), VP (pálido ventral), TO (tubérculo olfatorio), GP (globo pálido), Str (estriado), PA (paleostriatum augmentatum), LPO (lóbulo paraolfatorio), PP (paleostriatum primitivum) y DP (pálido dorsal). (Tomada de Marin et al, 1998).

Estudios recientes acerca de las conexiones, quimioarquitectura, distribución de marcadores bioquímicos, tales como dopamina, sustancia P y encefalinas y expresión de genes homeobox de las estructuras palidales y

estriatales de los ganglios basales han revelado que los vertebrados tetrápodos tienen patrones comunes de organización en sus ganglios basales (Smeets et al, 1999), este tipo de estudios muestran que algunas características están presentes en todos los amniotas: 1) la presencia de un sistema estriatopalidal dorsal y ventral, 2) la presencia de 2 tipos de poblaciones de neuronas estriatales de proyección químicamente diferentes 3) neuronas estriatales intrínsecas 4) una fuerte entrada dopaminérgica originada del tegmento del cerebro medio, 5) conexiones corticoestriatales y tálamoestriatales, 6) proyecciones estriatales y palidales hacia el tegmento del cerebro medio; y 7) Proyecciones de los ganglios basales hacia los centros premotores mesencefálicos e ístmicos, estas similitudes han llevado a la conclusión de que esta organización probablemente ya estaba presente en los antepasados de los amniotas (Marin et al, 1998; Smeets et al, 1999 y Reiner et al, 1998), por todo lo anterior se ha sugerido que el desarrollo de los ganglios basales, como se observa en los organismos actuales, se llevó a cabo en la transición evolutiva de anamniotas a amniotas (Marin et al, 1998; Reiner et al, 1998).

Por otro lado, se ha reportado que los ganglios basales de los amniotas contienen similares subpoblaciones de neuronas, identificando, a través de técnicas inmunohistoquímicas, los transmisores presentes en estas células, lo que sugiere que la evolución de los ganglios basales está altamente conservada y que estas estructuras juegan un papel motor similar en los amniotas. Sin embargo los ganglios basales de aves y reptiles parecen diferir de los GB de los mamíferos en que los primeros tienen una mayor influencia sobre las funciones motoras a través

de una salida hacia el tectum vía pretectum, mientras que en los mamíferos es por una salida hacia la corteza motora vía tálamo (Reiner et al, 1984). Aunque las conexiones y los transmisores neuronales en los GB de los amniotas parecen estar preservados, las diferencias sustanciales entre las células de estos organismos radican en el número y localización (Smeets et al, 1999).

## Organización funcional y estructural del estriado

Al estriado se le denomina como paleoestriado en los anamniotas, encontrándose también en los amniotas. Es en los amniotas que el estriado se diferencia claramente en paleoestriado y neoestriado, formando junto con el tálamo en los no-mamíferos un mecanismo integrador y motor, responsable en gran parte de la actividad estereotipada de estos animales. Con el desarrollo de la neocorteza (corteza no olfatoria) las fibras que conectan a ésta con los centros subcorticales atraviesan al neoestriado y corren junto al lado medial del globo pálido, formando la cápsula interna (Marin et al, 1998; Reiner et al, 1998).

Se ha reportado que el cuerpo estriado de las aves no es enteramente homólogo al estriado de los mamíferos, ya que esta estructura aviar incorpora algo de la neocorteza primitiva de los reptiles, siendo el *Paleostriatum augmentatum* (PA) y el lóbulo paraolfatorio (LPO) equivalentes al estriado de la rata (Farries y Perkel, 2000; Kröner et al., 2002). Aunque la organización telencefálica varía considerablemente entre los grupos de reptiles, el telencéfalo de todos los reptiles es caracterizado por un engrosamiento de la pared telencefálica lateral, la cual sobresale dentro del ventrículo lateral y es generalmente referido como la cresta ventricular anterio-dorsal (ADVR) de los reptiles. Muchos investigadores han considerado a la ADVR como la estructura homóloga del neoestriado e hiperestriado ventral de aves. En mamíferos el estriado es considerado como probable candidato para ser la estructura homóloga de la ADVR de reptiles, ya

que esta estructura (el estriado) es la única cresta intraventricular prominente dentro del telencéfalo de mamíferos (Striedter, 1997).

La mayor entrada de información hacia los GB llega al neostriado desde otras estructuras del cerebro, (Caudado-Putamen, Acumbens). Dentro del núcleo caudado-putamen las entradas glutamatérgicas desde las áreas corticales sensoriales, motoras y de asociación convergen con entradas glutamatérgicas provenientes del núcleo intralaminar talámico, así como con entradas dopaminérgicas desde la SNc y entradas serotoninérgicas desde el núcleo raquídeo dorsal (Wilson, 1988).

La mayor parte de las neuronas del estriado son neuronas de proyección, conocidas con el nombre de neuronas espinosas medianas (NEM's). En el primate y en la rata las NEM's constituyen el 77 % y el 95% respectivamente de la población de neuronas estriatales, presentan un soma de 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen un árbol dendrítico que ocupa un área aproximada de 300-500  $\mu\text{m}^2$ , el cual emite varias colaterales que arborizan profusamente (Bennett y Wilson, 2000).

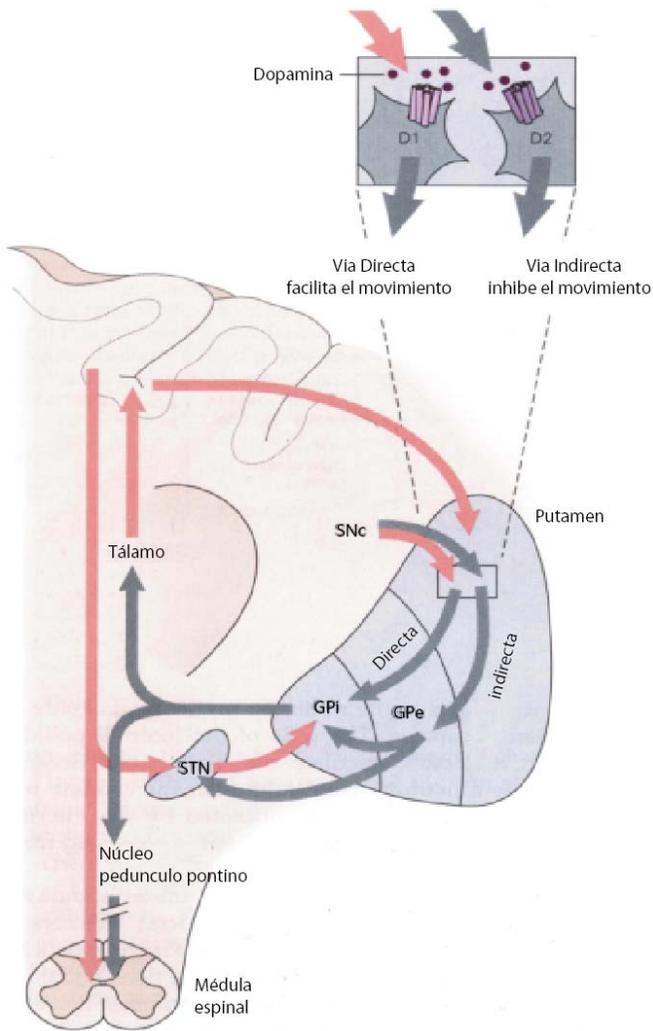
Las NEM's poseen potenciales de reposo alrededor de -85 mV, por lo que para generar potenciales de acción requieren de gran excitación. El glutamato actúa sobre receptores tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionato) y NMDA (N-metil-D-aspartato), este último mantiene la despolarización de las NEM's a -55 mV aproximadamente y hace más eficaces las entradas excitatorias por tiempos más prolongados. Dentro de las propiedades

electrofisiológicas intrínsecas de éstas neuronas se encuentra la presencia de conductancias rectificadoras de potasio: una corriente rectificadora entrante o anómala ( $I_{K_{ir}}$ ), la cual se activa a potenciales hiperpolarizados (alrededor de -80 mV) e impide que el potencial de la membrana se haga más negativo; y una corriente rectificadora entrante (principalmente  $I_A$ ) activada a partir de -60 mV, que estaciona el potencial de membrana en valores subumbrales o impide que se haga más positivo (Galarraga et al,1994), ésta conductancia, sensible a 4-aminopiridina (4-AP), produce una rampa y el retraso de la espiga en respuesta a pulsos de corriente despolarizante (324.6 ms aproximadamente) (Farries y Perkel, 2000; Venance y Glowinski, 2003; Nisenbaum y Wilson 1995). La activación de estas dos conductancias disminuye la resistencia de entrada de la NEM, este efecto se refleja como una disminución en la pendiente de la función corriente voltaje, en el rango de voltaje en la que cada una está activa (Galarraga et al, 1994). Asimismo, se ha reportado para las NEM's de mamífero un umbral de disparo entre -45 a -55 mV y una amplitud de la espiga de -60 mV .

En todos los amniotas, la parte estriatal de los ganglios basales es rica en acetilcolinesterasa (AChE) y colin-acetiltransferasa (CHAT), así como susbtancia - P (SP), encefalinas (ENK) y dopamina (Reiner et al, 1998). Sin embargo, las diferentes estirpes celulares no parecen estar distribuidas uniformemente en el estriado de todos los amniotas. Al menos en mamíferos, el estriado medial está organizado en dos tipos de compartimientos distinguibles neuroquímicamente y morfológicamente, los parches o estriosomas y la matriz o matriosomas (Graybiel, 1990; Reiner et al, 1998). Sin embargo, esto no ha sido demostrado para los

saurópsidos, por lo tanto, la compartimentalización parece ser una característica exclusiva de los mamíferos. No obstante, se ha reportado la presencia de AChE, receptores a opiáceos tipo  $\mu$  (MOR) y calbindina (características presentes en las neuronas del estrioso de mamíferos) en neuronas de proyección de aves y reptiles (Reiner et al, 1998).

Dentro de esta compartimentalización del estriado en los mamíferos el estrioso recibe su mayor entrada de la corteza límbica y proyecta primariamente hacia la SNc y contiene SP, dinorfina y ENK, las NEM's de este compartimiento expresan MOR, mientras que las NEM's de la matriz no (Gerfen, 1992). Las NEM's de la matriz pueden ser formar dos circuitos sinápticos diferentes, con propiedades farmacológicas diferentes: las de la "vía directa" y las de la "vía indirecta" (Fig. 3). Las NEM's de la vía directa proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y el segmento interno del globo pálido, muestran alta expresión de receptores dopaminérgicos tipo D1 y son ricas en SP y dinorfina; mientras que las NEM's de la vía indirecta proyectan al segmento externo del globo pálido, muestran alta expresión de receptores dopaminérgicos D2 y contienen neuroquinina B y ENK (Gerfen, 1992; Nicola et al, 2000). Sin embargo hay estudios que han revelado la presencia de NEM's que expresan tanto receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2, como SP y ENK (Surmeier et al, 1996).



**Figura 3. Conexiones anatómicas del circuito de los ganglios basales y la conexión talamo-cortical, indicando paralelamente la vía directa e indirecta desde el estriado hacia los núcleos de salida de los ganglios basales.** Dos tipos de receptores (D1 y D2) están localizados sobre diferentes grupos de neuronas de salida del estriado, dando lugar a la vía directa y vía indirecta. Las flechas más claras indican la vía excitatoria, mientras que la más oscura corresponde a la vía inhibitoria. Abreviaciones: Gpe (globo pálido externo), Gp (globo pálido interno), SNc (substancia nigra pars compacta), STN (núcleo subtalámico). (Modificado de Kandel et al, 2000).

Además de las NEM's existen dentro del estriado otras estirpes neuronales, estableciendo sinapsis dentro de este núcleo, estas células son conocidas como interneuronas. De manera general se han descrito para mamíferos principalmente tres tipos de interneuronas, aunque también se han identificado en aves (Farries y Perkel, 2000) y reptiles (Reiner et al, 1998):

A) *Interneuronas colinérgicas*: Constituyen del 1-2 % del total de células del estriado de rata, expresan la enzima AChE, su soma mide 50-60  $\mu\text{m}$  de diámetro y exhiben grandes árboles dendríticos ligeramente espinosos con un diámetro aproximado de 500  $\mu\text{m}$ . Estas interneuronas constituyen una de las mayores fuentes de acetilcolina del sistema nervioso central (Bennett et al, 2000; Wilson, 1992).

B) *Interneuronas que contienen Parvalbúmina*: Son células no espinosas de tipo GABAérgico, su soma tiene un diámetro aproximado de 10-30  $\mu\text{m}$ , asimismo presentan varicosidades en las zonas más distales del soma y poseen campos dendríticos locales y extendidos (Bennett et al, 2000; Wilson, 1992).

C) *Interneuronas que contienen somatostatina y óxido nítrico*: Son neuronas de tipo bipolar y su soma mide entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, sus dendrítas son lisas y rara vez ramifican. Presentan disparo regular con pronunciada adaptación y expresan la enzima sintasa de óxido nítrico (Bennett et al, 2000; Wilson, 1992).

Es importante mencionar que se ha observado que la proporción de interneuronas es mayor en primates y en humanos que en otros mamíferos, asimismo la proporción de interneuronas también es menor en organismos filogenéticamente inferiores a mamíferos (Reiner et al, 1998).

## El Sistema Dopaminérgico

La dopamina (DA) es una catecolamina neuromoduladora predominante en el cerebro de los mamíferos, ésta controla una variedad de funciones, incluyendo la actividad locomotora, cognición, emoción, reforzamiento positivo y regulación endocrina. Esta catecolamina juega papeles múltiples como un modulador de la función cardiovascular, liberación catecolaminérgica, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale et al, 1998).

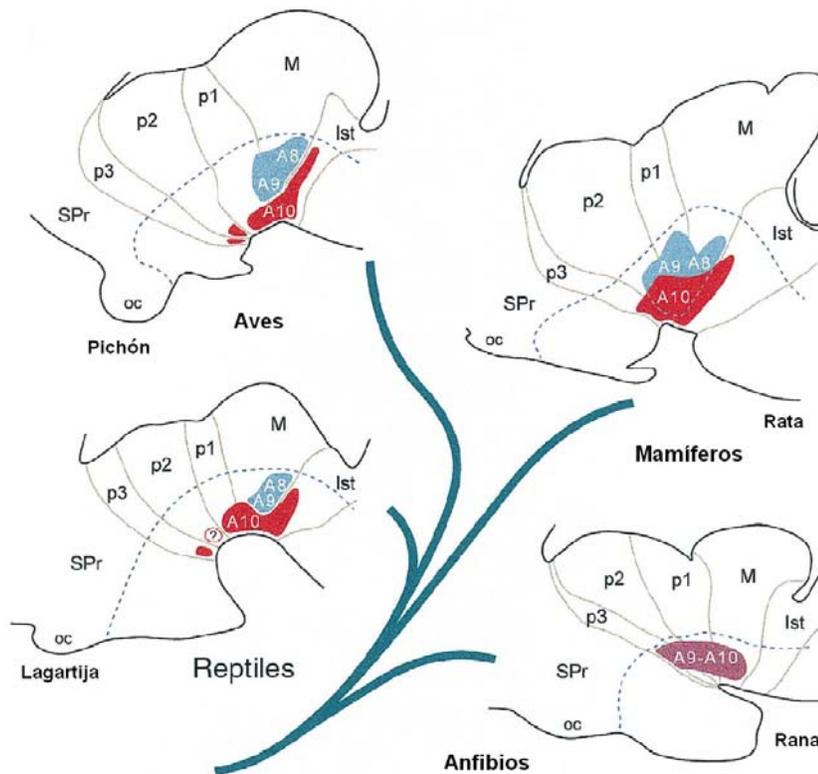
El sistema dopaminérgico ha sido objeto de muchas investigaciones en los últimos treinta años, principalmente por estar involucrado en algunas patologías como la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, síndrome de Tourette e Hiperprolactinemia; patologías relacionadas con la inadecuada regulación de la transmisión dopaminérgica (Chesselet y Delfs, 1996).

El núcleo blanco de la aferencia dopaminérgica dentro de los ganglios basales es el estriado, recibiendo DA de la SNc y AVT. Los axones de las neuronas dopaminérgicas entran al estriado formando varicosidades y estableciendo contactos sinápticos en el cuello de las espinas de las NEM's y a su paso sinapsis en *passant* en prácticamente toda la superficie del estriado (Wilson, 1998). La aplicación de agonistas y antagonistas dopaminérgicos promueven movimientos estereotipados en los amniotas; los agonistas incrementan la liberación de SP, e inhiben la liberación de ENK en las neuronas estriatales;

mientras que los antagonistas producen bradicinesia o acinesia, decrecentando los niveles de SP e incrementando las ENK (Reiner et al, 1998).

El sistema dopaminérgico de aves, reptiles y mamíferos juega un papel similar en el control del movimiento. Las subdivisiones estriatales y palidales en los anamniotas reciben una escasa entrada dopaminérgica tegmental y una muy pequeña entrada cortical. Por el contrario, en los modernos amniotas el estriado recibe abundante entrada dopaminérgica y cortical tegmental (Reiner et al, 1998).

En los anamniotas estudiados, de forma similar que en los amniotas, la entrada dopaminérgica proviene de grupos celulares de la sustancia nigra (A9) y del área tegmental ventral (A10) que se localizan en el segmento mesencefálico, asimismo se ha comprobado que el cerebro de todos los vertebrados posee segmentos equivalentes, y que los grupos celulares dopaminérgicos A9 y A10 de los amniotas se originan del tegmento mesencefálico como del diencefalo, así como de segmentos ístmicos, correspondiendo a los prosomeros 1 a 3. En mamíferos, el grupo celular A9 proviene de tres diferentes segmentos (p2, p1 y cerebro medio), mientras que las poblaciones celulares de A10 provienen de distintas porciones de los segmentos p3, p2, p1, así como del cerebro medio y del mesencefalo (Marin et al, 1998). En los anfibios, los complejos celulares A9-A10 de los amniotas están presentes con pequeñas diferencias (Marín et al, 1997) (Fig. 4). Estos datos indican que la inervación dopaminérgica es un mecanismo de modulación de la función estriatal altamente conservado en todos los tetrápodos.



**Figura 4. Localización y desarrollo de los grupos celulares dopaminérgicos A8-A10 en los tetrápodos.** El dibujo muestra una aproximación segmental comparativa aplicada al estudio de la distribución de los grupos celulares dopaminérgicos de los tetrápodos en el área ventral tegmental (A10), Substancia nigra pars compacta (A9) y campo retrorubral (A8). Las uniones de cada segmento están representadas por líneas sólidas, mientras que la línea punteada muestra la unión entre las placas alar y basal. (Modificado de Marin et al, 1998).

## Receptores Dopaminérgicos

La primera evidencia de la existencia de los receptores a dopamina en el sistema nervioso central se obtuvo a partir de estudios de tipo bioquímico y farmacológico, mostrando que la dopamina (DA) era capaz de estimular la

adenilato ciclasa (AC). Keabian y Calne (1979) propusieron la existencia de dos tipos de receptores para la dopamina: uno acoplado positivamente a la enzima adenilato ciclasa denominado D1 y otro que la inhibe, el D2. Estudios subsecuentes confirmaron esta clasificación y los receptores D1 y D2 fueron claramente diferenciados farmacológicamente, bioquímicamente, fisiológicamente y por su distribución anatómica (Missale et al, 1998).

Posteriormente, gracias a la introducción de técnicas como la clonación de genes, tres nuevos tipos de receptores dopaminérgicos fueron caracterizados como isoformas alternas de los receptores D1 y D2, los cuales fueron llamados D3, D4 y D5/D1b. Basándose en las características farmacológicas, bioquímicas y estructurales similares se establecieron los receptores D3 y D4 dentro de la familia D2 y al receptor D5/D1b como perteneciente a la familia D1 (Civelli et al, 1993, Strange, 1993, Missale et al, 1998).

Se han descrito dos principales mecanismos relacionados con la diversificación molecular de las dos familias de receptores dopaminérgicos (D1 y D2) son: 1) mecanismos de duplicación de genes, que dan origen a diferentes genes hermanos, los cuales codifican subtipos de receptores o pseudogenes; y 2) especiación, la cual origina especies homólogas y polimorfismo genético que provee variantes de receptores encontradas dentro de las mismas especies. (Vernier et al, 1995).

La estructura primaria de los receptores dopaminérgicos clonados, revela que son miembros de una familia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembranales (TM). Los miembros de ésta familia muestran una considerable conservación en su secuencia de aminoácidos (Probst et al, 1992) y un alto grado de homología entre sus dominios transmembranales, reportándose un 40 % de homología entre receptores dopaminérgicos humanos D1 y D2 (Deary et al, 1990, Gingrich y Caron, 1993), sin embargo ambas familias de receptores difieren notablemente en el número de aminoácidos presentes en la tercera asa intracelular. De igual manera, como en los receptores acoplados a proteínas G, los receptores dopaminérgicos poseen dos residuos de cisteína en la segunda y tercer asa extracelular (Gingrich et al, 1993), sugiriéndose, que estos forman un puente disulfuro intramolecular para estabilizar la estructura del receptor (Fraser, 1989). Los residuos NH<sub>2</sub>-terminal tienen un número similar de aminoácidos en todos los subtipos de receptores dopaminérgicos, asimismo se encuentra un número variable de sitios de N-glucosilación. El segmento COOH-terminal es cerca de siete veces más largo en los receptores D1 que en los receptores D2, es rico en residuos de serina y treonina, y contiene residuos de cisteína, los cuales podrían contar con un grupo palmitato, el cual funge como punto de anclaje a la membrana celular (O'Dowd et al, 1989) (Fig. 5).

A través de estudios de mutación dirigida en receptores catecolaminérgicos, modelos proteicos  $\beta_2$  y  $\alpha_2$  adrenérgicos (Strader et al, 1989) y receptores D2 (Hibert et al, 1993) se ha sugerido que la unión de los agonistas probablemente ocurre dentro de los dominios TM hidrofóbicos. Los residuos altamente

conservados están en el centro de la proteína que se define como hendidura estrecha de unión, la cual probablemente correspondería al sitio de unión de los agonistas. En particular, un residuo aspartato en el dominio TM3 está probablemente involucrado en el anclaje del grupo amina de la catecolamina (Hibert et al, 1993). Asimismo se ha demostrado que dos residuos serina en el dominio TM5 son donadores de hidrógenos, los cuales se unen a los hidroxilos del anillo catecol, formando puentes de hidrógeno (Strader et al, 1989; Tomic et al, 1993). Una fenilalanina en el dominio TM6, que se encuentra altamente conservada en todos estos receptores catecolaminérgicos, podría establecer interacciones con el anillo aromático del ligando. Se ha observado también, que un residuo aspartato, altamente conservado, en el dominio TM2 parece jugar un papel crucial en la activación de los receptores  $\beta_2$  y  $\alpha_2$  adrenérgicos y dopaminérgicos D1 y D2; así como en la unión con el agonista. Se ha sugerido que la interacción entre este aspartato y el agonista puede ser modulada por  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$  (Hibert et al, 1992; Horstman et al, 1990; Neve et al, 1991).

Las propiedades farmacológicas de los diferentes receptores dopaminérgicos han sido extensamente estudiadas, ello se debe principalmente las implicaciones terapéuticas que tienen en el tratamiento de diferentes patologías (Sokoloff y Schwartz, 1995). Si bien los resultados arrojados por estos estudios son variables, debido entre otras cosas a los distintos tipos celulares en donde han sido realizados, diferentes hallazgos han definido el perfil farmacológico de estos receptores. Las dos familias de receptores dopaminérgicos tienen diferente afinidad por la DA, ya que ésta es más afin a los receptores D2

que a los D1, mientras que para los primeros ésta catecolamina tiene una constante de inhibición ( $K_i$ ) menor a 50 nM, para los receptores D1 se ha reportado una  $K_i$  entre 0.5 y 5  $\mu$ M (Missale et al, 1998). Entre los agonistas más selectivos para la familia D2 se encuentran el quinpirole y el quinolorane. El quinpirole posee una  $K_i$  de 576 nM para la isoforma D2, de 5.1 nM para la isoforma D3 y de 46 nM para los receptores D4 (Sokoloff et al, 1990). El quinolorane por otro lado, tiene una  $K_i$  de 341 nM para el receptor D2 y de 3.6 nM para el D3 (Foreman et al, 1989). Sin embargo, a pesar de estas caracterizaciones farmacológicas aún no hay agonistas selectivos para cada uno de los subtipos de la familia D2 (Vallone et al, 2000). Dentro de los agonistas selectivos de la familia D1 se encuentra la familia de las benzazepinas, de éstas, uno de los ligandos más potentes es el SKF-81297. Este fármaco posee una  $K_i$  de 2.2 nM para estimular a la enzima adenilato ciclasa (Andersen y Jansen, 1990).

Por otro lado, y con respecto a su localización en el neocórtex, estudios recientes en rata han demostrado que ambas familias de receptores se encuentran colocalizados virtualmente en todas las NEM's (Surmeier et al, 1993), tanto en preparaciones en cultivo como en rebanadas de cerebro (Aizman et al, 2000). Estos resultados han sido corroborados por David y Harrison (2002) quienes reportaron que un 80 % de NEM's en rebanadas de cerebro coexpresan receptores D1 y D2. Diferentes estudios funcionales utilizando agonistas selectivos para las dos familias de receptores dopaminérgicos, han descrito respuestas D1 y



### ***Caracterización funcional de la familia D1***

Funcionalmente los receptores D1 parecen afectar la actividad de los canales de calcio, asimismo parecen estimular la liberación de calcio almacenado intracelularmente, a través de activación de la vía del fosfatidilinositol (PI), el cual es hidrolizado por la fosfolipasa C (PCL), resultando en la producción de inositol-1,4,5-trifosfato, el cual moviliza el calcio intracelular (Dearry et al, 1990).

La entrada de calcio al interior de la NEM juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo de la NEM (Galarraga et al, 1989). Cuando el potencial de membrana se mantiene a potenciales despolarizados ( $> -60$  mV) en donde la influencia de la rectificación anómala es mínima, la activación de receptores D1 promueve la generación de mesetas despolarizantes prolongadas (cientos de milisegundos), mediadas principalmente por conductancias de calcio tipo L, estos eventos acercan el potencial de membrana hacia el umbral para la generación de potenciales de acción, facilitando e incrementando la frecuencia de disparo de la célula (Hernández-López et al, 1997).

En neuronas estriatales de rata y en células GH4C1 transfectadas con el receptor D1, el agonista D1 incrementó las corrientes de calcio a través de canales tipo L, en ambos casos, el efecto fue mimetizado por análogos de AMPc y bloqueado por inhibidores de la PKA, sugiriendo esto que dicho fenómeno podría ser el resultado de la fosforilación de los canales de calcio por la PKA (Surmeier et al, 1995).

Por otro lado, la fosfoproteína DARP-32, regulada por dopamina y AMPc es un sustrato de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) expresada en la mayor parte de los tejidos sensibles al agonista D1, y se ha demostrado en el estriado de rata que la fosforilación de DARP-32 incrementa con la administración de este agonista (SKF-38393), la forma fosforilada de esta proteína es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa-1 (PP-1), favoreciendo la permanencia del estado fosforilado de las diferentes proteínas efectoras, entre las que se encuentran los canales de calcio tipo L (Greengard et al, 1998 y 1999; Surmeier et al, 1995).

Asimismo, en neuronas estriatales de rata los agonistas D1 reducen las corrientes de calcio a través de canales tipo P y N, este efecto también es mimetizado por análogos de AMPc y bloqueado por inhibidores de la PKA y por el inhibidor de fosfatasas, el ácido okadaico. El modelo propuesto para la reducción de estas corrientes es que la estimulación de la PKA, por activación del D1, activaría a la PP-1, y con ello ésta última desfosforilaría los canales N y P, que pasarían a un estado no conductivo (Surmeier et al, 1995). Sin embargo esta posibilidad no ha sido demostrada experimentalmente en la NEM.

La activación selectiva de receptores D1 promueve también la reducción de corrientes de sodio en NEM's, por activación directa del canal a través de la PKA (Nicola et al, 2000). En ésta dirección Cepeda y colaboradores (1995) han descrito que la activación de receptores D1 reduce las corrientes persistentes de sodio susceptibles de ser bloqueadas por tetrodotoxina y que podrían estar implicadas

en la regulación de oscilaciones rítmicas, así como en el disparo repetitivo de la NEM.

Otro blanco para la vía de señalización de los receptores D1, son los canales de potasio activados a potenciales de membrana hiperpolarizados ( $< -80$  mV) y que regulan la rectificación anómala de la NEM (atribuida principalmente a los canales Kir 2.2 y 2.3) (Pacheco-Cano et al, 1996), a este respecto se ha visto que la activación de los receptores D1 incrementa la rectificación de la célula (Nicola et al, 2000; Pacheco-cano et al, 1996). También se ha demostrado que el uso de agonistas selectivos para los receptores D1 disminuye corrientes de potasio salientes de inactivación lenta (IAS) activadas por la despolarización de la NEM, sin embargo estos efectos fueron atribuidos principalmente a un efecto alostérico o bloqueo directo sobre el canal, más que a una vía de señalización mediada por AMPc (Nisenbaum et al, 1998)

### ***Caracterización funcional de la familia D2***

La activación selectiva de los receptores D2 en las NEM's del neostriado disminuye el nivel basal de fosforilación de la proteína DARP-32 además de revertir el aumento en la fosforilación de ésta proteína, inducida previamente por los receptores D1, forskolina (un activador de la enzima adenilato ciclasa), así como por análogos del AMPc (Nishi et al, 1997). La acción de los receptores D2, es dependiente del calcio intracelular y es bloqueada por la inhibición de la proteína fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina (PP2-B), lo que sugiere que

la activación de estos receptores provoca un aumento en los niveles intracelulares de calcio y, por consiguiente, la activación de la calcineurina, la cual desfosforila a la DARP-32 (Nishi et al, 1997).

Los mecanismos por los cuales la activación de los receptores D2 estimulan el aumento en los niveles de calcio intracelular no han sido descritos (Greengard et al, 1999). A este respecto se ha observado que en algunos sistemas de células transfectadas, el receptor D2 produce un incremento en el calcio intracelular vía hidrólisis del PI. Sin embargo en muchas otras líneas celulares, el receptor D2 no se acopla a este segundo mensajero, además los receptores D2 de la glándula pituitaria han mostrado inhibir el metabolismo del PI. Por otro lado en las células NG108-15 los receptores D2 sí muestran un aumento en la liberación de calcio almacenado intracelularmente.

En cultivos primarios de neuronas estriatales (Schinelli et al, 1994) y rebanadas de cerebrales de rata (Hernández-López et al 2000), los agonistas D2 causan una potenciación en la liberación de ácido araquidónico (AA), mediada por calcio, sin embargo el mecanismo por el cual estos receptores provocan este fenómeno no está claro. Por otro lado la activación de la proteína fosfolipasa C incrementa al máximo la liberación de AA en presencia de agonistas D2, asimismo incrementa la potencia de los agonistas que provocan esta respuesta (Di Marzo et al, 1993). Esta evidencia sugiere que la potenciación de la liberación del AA es mediada por alteraciones en la actividad de la PKC.



## **Distribución de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en amniotas**

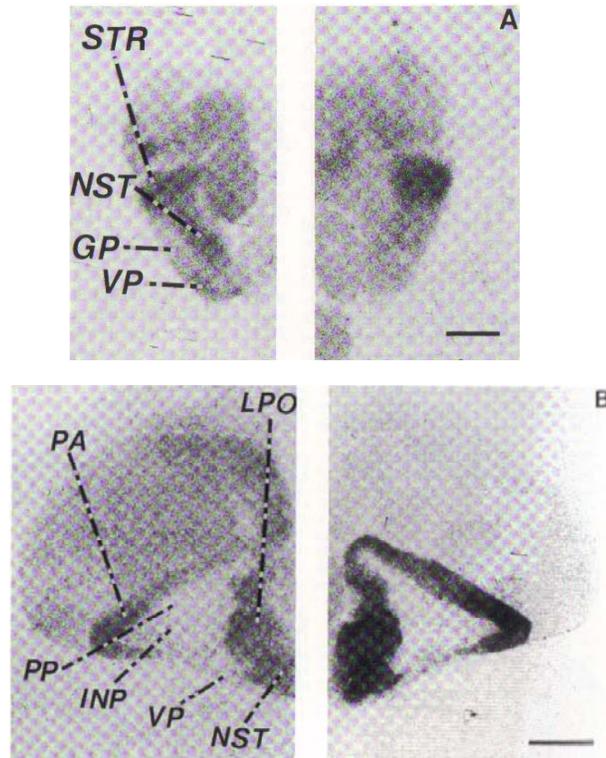
### ***Distribución anatómica en los ganglios basales***

Los estudios acerca de la distribución de la DA y sus receptores en diferentes áreas del cerebro que se han realizado en los ganglios basales de diferentes vertebrados indican que la distribución anatómica de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 es muy similar entre los amniotas (Richfield et al, 1987). Una característica en común de los receptores dopaminérgicos en los amniotas es la heterogeneidad en su distribución y densidad, algunas diferencias se encuentran en el contenido de DA estriatal, y otros aspectos funcionales como la interacción DA-ACh y la anoxia (Smeets et al, 1992 y 2000; Milton y Lutz, 1998; Henselmans et al, 1991).

Se ha reportado que en el estriado de la tortuga los receptores dopaminérgicos tipo D1 están presentes en la cama del núcleo del estriado terminalis, pálido ventral y la sustancia nigra; los receptores tipo D2 se encuentran solo en la cama del núcleo terminalis del estriado y el globo pálido (Richfield et al, 1987). En otros vertebrados como las aves, se ha reportado que el cerebro contiene receptores D1 y D2 en el paleostriatum augmentatum, lóbulo paraolfatorio, paleostriatum primitivum, núcleo intrapeduncular, pálido ventral, cama del núcleo terminalis del estriado y núcleo tegmental pedúnculo pontino y pars compacta. La porción lateral del paleostriatum augmentatum contiene más D1 y D2 que la porción medial (Richfield et al, 1987). (Fig. 6). A pesar de los

estudios sobre la distribución anatómica de los receptores dopaminérgicos en estos organismos se desconoce si estos receptores se encuentran colocalizados en la misma célula.

---



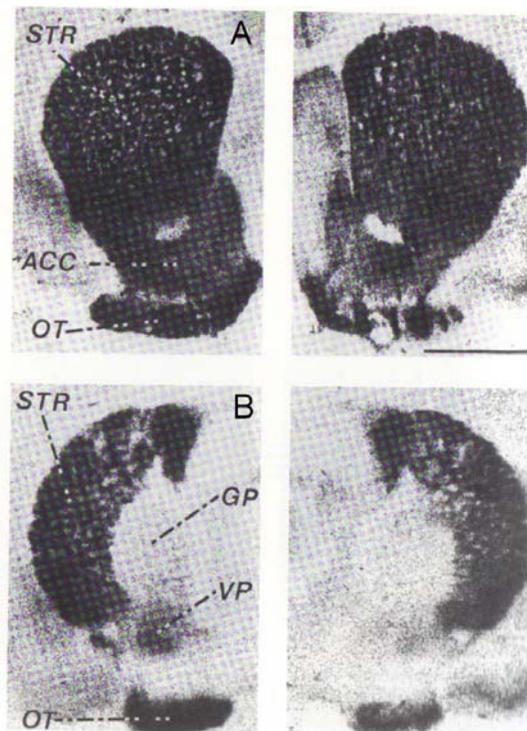
**Figura 6. Autoradiografías de los receptor dopaminérgico D1(columna de la izquierda) y D2 (columna de la derecha) en diferentes porciones de los ganglios basales de tortuga y pichón.** La densidad de estos receptores se visualizó incubando las rebanadas con un ligando tritiado (LKB Ultrafilm-3H), de 10 a 14 días para visualizar el receptor D1 y de 14 a 21 días para el receptor D2. Las partes más oscurecidas presentan una mayor densidad de receptores dopaminérgicos D1 o D2. En A se muestran los autodiagramas de los ganglios basales de la tortuga mientras que en B se muestran los del pichón. Escala de la barra: 2 mm. Abreviaturas: STR: estriado, NST: cama del núcleo del estriado terminal, GP: globo pálido, VP: pálido ventral, LPO: lóbulo paraolfatorio, PA (paleostriatum augmentatum), PP (paleostriatum primitivum), INP (núcleo intrapeduncular). (Tomado de Richfield et al, 1987).

---

En la rata los receptores dopaminérgicos están presentes en todos los ganglios basales (Fig. 7). Ni la familia D1 ni la familia D2 demostraron heterogeneidad en su distribución sobre el estriado dorsal. El núcleo acumbens no

tuvo áreas de más alta y baja unión, comparada con el promedio para ambos receptores (D1 y D2), mientras que el tubérculo olfatorio tuvo una clara discontinuidad en los sitios de unión para el receptor D2. En el estriado se encontró un gradiente decreciente de la región rostral a la caudal en el orden de 13-14% para ambos receptores. De la misma manera en el estriado caudal se encontró un gradiente, pero ascendente, de la región dorsal a la ventral en el orden de 22-28%.

---



**Figura 7. Autoradiografías de los receptores dopaminérgicos D1 (columna de la izquierda) y D2 (columna de la derecha) en diferentes porciones de los ganglios basales de rata.** A. Secciones a través del núcleo intrapeduncular y la sustancia nigra. B. Secciones a través del estriado y pálido. La densidad de los receptores dopaminérgicos está presentes en estos dos núcleos. Los receptores dopaminérgicos se distribuyen heterogeneamente en esas estructuras. El núcleo intrapeduncular contiene sólo receptores D1, los cuales son más prominentes en la periferia y en la porción medialde este núcleo. La sustancia nigra pars reticulata y pars compacta contienen ambos receptores dopaminérgicos, con un gradiente decrecientde la porción medial a la lateral. Escala de la barra: 2 mm. Abreviaturas: TO (tubérculo olfatorio), ACC (núcleo accumbens), las demás se presentan en la figura 6. (Tomado de Richfield et al, 1987).

---

En el núcleo entopeduncular se han identificado zonas prominentes de sitios de unión heterogéneos, encontrándose un incremento de estos para el receptor D1 a lo largo de la porción medial. Por su parte la sustancia nigra pars compacta y pars reticulata, en su porción medial, mostraron un incremento en los sitios de unión para ambos receptores. Por otro lado, el claustrum mostró un patrón homogéneo para los sitios de unión del receptor D1, mientras que para el receptor D2 no se detectaron. La densidad del receptor D1 fue completamente similar entre las estructuras de los GB, excepto para el pálido y el claustrum; mientras que la densidad del receptor D2 varió más dramáticamente, no detectándose en el núcleo entopeduncular y el claustrum, mostrándose en un 20-30% en la sustancia nigra y en un 8-20% en el globo pálido y pálido ventral (Richfield et al, 1987).

### ***Distribución celular***

En 1990 Gerfen y colaboradores utilizando sondas para hibridación *in situ* en NEM's de rata, identificadas como estriado-nigrales, con el uso de trazadores retrógrados, encontraron que un amplio porcentaje de estas células mostraban marca positiva para el ARNm de los receptores D1, así como para los péptidos sustancia P y dinorfina. De este grupo de neuronas, solo un pequeño porcentaje (aproximadamente 17%) presentaba marca para la sonda de receptores D2 y el neuropéptido encefalina. Por otro lado, las neuronas con marca positiva al neuropéptido encefalina colocalizaban con la presencia de ARNm del receptor D2.

Estas neuronas constituirían presumiblemente la vía estriado-palidal (Gerfen et al, 1990; Le Moine et al, 1990).

Mediante el uso de transcripciones inversas seguidas de reacciones en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en células disociadas de rata se ha demostrado que neuronas con niveles detectables de sustancia P pero no encefalina (45.71 %), expresaban abundante ARNm del receptor D1. Una subpoblación considerable de este grupo co-expresaba ARNm para los receptores D2 (19%), D3 (38%) ó D4 (25%). Neuronas con ARNm para encefalina pero no para sustancia P (25.71%), expresaban niveles abundantes de ARNm para los receptores D2 y una subpoblación de este grupo (10-25%) co-expresaba ARNm para las dos isoformas D1 y D5. Asimismo, se ha descrito la presencia de una población de NEM's (28.71%) con niveles detectables de ARNm para ambos péptidos. Este grupo se caracterizó por co-expresar abundante ARNm para los receptores D1 y D2 y varias de las isoformas de cada una de las dos familias (Surmeier et al, 1993; Nicola et al, 2000).

Por otro lado, estudios electrofisiológicos en el neostriado de la rata apuntan a la colocalización de receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en la misma célula (Hernandez-López et al, 2000 y Pérez-Garci, 2003).

La expresión de receptores dopaminérgicos en los tres tipos de interneuronas del neostriado, no ha sido estudiada en detalle, debido principalmente a su escaso número en este núcleo. Trabajos de hibridación *in situ*

en rata demostraron la presencia de ARNm para los receptores D2 pero no para los D1 en interneuronas colinérgicas (Le Moine et al, 1990). Posteriormente, la aplicación de RT-PCR en estas neuronas demostró la expresión de receptores D2 (en sus dos isoformas), así como la presencia de receptores D5 (Nicola et al, 2000; Yan y Surmeier et al, 1997)

## ANTECEDENTES

Se ha visto que las propiedades electrofisiológicas de las NEM's, así como de las interneuronas con espigas de bajo umbral (low-threshold spike, LTS) del estriado de aves son muy parecidas a las descritas en mamíferos, sin embargo Farries y Perkel (2000) han reportado que el estriado de las aves contiene un tipo de neuronas espinosas medianas de naturaleza "anómala" no descritas en mamíferos, estas neuronas exhiben propiedades electrofisiológicas en ocasiones normales o iguales a las NEM's (rectificación entrante en respuesta a pulsos hiperpolarizantes y rampa en respuesta a pulsos despolarizantes), pasando a un estado anómalo o alterado "durante el registro", ya que pierden la rampa en respuesta a un pulso despolarizante y las espigas disminuyen su amplitud e incrementan su duración. Asimismo, otra diferencia entre las neuronas estriatales de aves y mamíferos es la presencia de unas interneuronas de disparo rápido y sin espinas (AF aspiny fast-firing) (Farries and Perkel, 2000), que podrían ser una versión modificada de las interneuronas colinérgicas (LA, long-lasting afterhyperpolarization) de mamíferos (Kawaguchi, 1993), pues aunque estas neuronas (AF) disparan espontáneamente lo hacen a más altas frecuencias que las colinérgicas, por otro lado las AF pierden el pospotencial de larga duración, característico de las interneuronas colinérgicas de mamíferos, y parecen ser morfológicamente distintas a éstas; también podrían ser una versión de las interneuronas parvalbuminérgicas (FS, fast-spiking) de mamíferos (Kawaguchi, 1993), sin embargo, a diferencia de éstas, las AF de aves disparan

espontáneamente en rebanadas, muestran una rectificación entrante tiempo-dependiente y cuando son inyectadas con pulsos de corriente despolarizante no producen pausas en el disparo. Todos estos datos permiten apoyar la idea de que la organización y las propiedades funcionales en general de los ganglios basales ha sido conservada en mamíferos y aves, aunque ello implique que el estriado de aves no sea idéntico al estriado dorsal de mamíferos.

Por otro lado, funcionalmente, estudios en mamíferos han reportado que el efecto de la activación del receptor dopaminérgico D1 puede ser inhibitoria a potenciales de membrana hiperpolarizantes (aprox. -80mV) o excitatoria a potenciales despolarizantes (aprox. -55 mV). Los mecanismos por los cuales estos receptores aumentan la actividad evocada no sólo involucra la disminución de corrientes de  $K^+$  (Pacheco-Cano et al, 1996), sino también el aumento de las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L (Hernández-López et al, 1997). Por otro lado, la activación de receptores dopaminérgicos tipo D2 tiene una respuesta antagónica al D1, provocando una disminución en la generación de mesetas despolarizantes, en la frecuencia de disparo y duración del potencial de  $Ca^{2+}$ , debido a una reducción en las conductancias de  $Ca^{2+}$  tipo L por la activación de fosfatasa calcineurina vía fosfolipasa  $C\beta 1$ -Inositol 1,4,5-trifosfato. (Hernández-López et al, 2000; Pérez- Garci, 2003). Estos resultados han sido confirmados en otros núcleos así como en otros tipos neuronales del cerebro de mamíferos tales como corteza (Berretta, et al, 1999), hipocampo (Graef et al, 1999), núcleo acumbens

(Nicola et al, 2000), células ováricas de hamster (Lajiness et al, 1993) y neuroblastoma de roedores (Lukyanetz et al, 1998).

La activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en aves ocurre de manera similar a lo descritos en mamíferos, aumentando y disminuyendo la excitabilidad de las NEM respectivamente, con la principal diferencia de que la activación del receptor D1 en aves aumentó la excitabilidad aún en potenciales hiperpolarizados (Ding y Perkel, 2002), mientras que en mamíferos no, por el contrario la disminuyó.

A pesar de estos estudios electrofisiológicos sobre esta importante catecolamina (DA), la mayor parte de estas investigaciones en grupos filogenéticamente inferiores a mamíferos se limita a su distribución y localización en los ganglios basales (Smeets et al, 2000 y 2003), sin embargo es poco lo que se conoce acerca del papel funcional de la DA en dichos organismos (Farries y Perkel, 2000; Kröner et al, 2002).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aves y mamíferos son filogenéticamente grupos terminales de la evolución de vertebrados que se originaron a partir de reptiles, por lo que esta última clase de organismos ocupa un lugar crucial en la evolución de los cordados. A pesar de ello, no se han caracterizado electrofisiológicamente las estirpes neuronales de los GB en los reptiles, siendo este estudio de suma importancia, pues conociendo y comparando desde un punto de vista filogenético los parámetros electrofisiológicos de las células como la frecuencia de disparo neuronal, el patrón de disparo, la latencia del potencial de acción, los umbrales, las posibles conductancias iónicas que participan en la dinámica de la membrana etc, podemos conocer en qué momento de la evolución podría haber cambiado el papel funcional de dichas células.

Por otro lado, dentro de los GB de los amniotas la presencia de receptores dopaminérgicos en el circuito nigro-estriatal, cruciales para el control motor, esta bien documentada, así la distribución de las familias D1 y D2 se han reportado en reptiles, sin embargo, los aspectos funcionales de su modulación en esta clase de vertebrados, que son decisivos para la evolución de los cordados aún se desconocen. De esta manera, el establecimiento de las diferencias y las similitudes de la modulación dopaminérgica entre mamíferos y reptiles permitiría comprender, entre otras cosas, la forma en que las funciones motoras estriatales pudieran haber evolucionado.

# OBJETIVOS

## Generales

**A)** Caracterizar electrofisiológica y anatómicamente a las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga.

**B)** Estudiar el efecto modulador de la dopamina sobre la excitabilidad de las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga, a través de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2.

**C)** Comparar las propiedades electrofisiológicas y anatómicas de la tortuga con las observadas en la rata.

## Particulares

**A)** Obtener curvas Intensidad-Voltaje (I-V) a un potencial de membrana de -80 mV, inyectando pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes de diferentes intensidades.

**B)** Obtener curvas Intensidad-Frecuencia (I-F) a un potencial de membrana de -60 mV, inyectando pulsos de corriente despolarizantes de diferentes intensidades.

**C)** Identificar morfológicamente a las neuronas registradas marcándolas intracelularmente con biocitina después de los registros electrofisiológicos para su caracterización y correlación anatómica.

**D)** Caracterizar la respuesta moduladora de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 sobre el disparo repetitivo de las NEM's del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga, a través de curvas I-F, en condiciones control y en presencia de agonistas selectivos para la familia D1 y la familia D2.

**E)** Caracterizar la respuesta moduladora de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 sobre la meseta de calcio de las NEM's del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga, a través de la inyección de pequeños pulsos de corriente despolarizantes.

# METODOLOGÍA

## Reptiles

Para la realización de este proyecto se utilizaron tortugas como grupo representativo de reptiles. Esta decisión se tomó con base en: A) Que los antecesores directos de los mamíferos se han extinguido. Sin embargo uno de los grupos con linaje evolutivo muy antiguo corresponde al de las tortugas, lo que lo hace adecuado para este tipo de estudios. B) La preparación de tortuga ofrece múltiples ventajas para la elaboración de estudios electrofisiológicos, ya que en una sola rebanada es posible tener todas las conexiones que el estriado recibe, tanto los núcleos aferentes (corteza) como los núcleos eferentes (globo pálido, sustancia nigra), además de que en esta preparación se pueden realizar registros de varios días de duración, ya que el cerebro de la tortuga es muy resistente a la anoxia y se pueden obtener rebanadas de gran grosor. C) Existen algunos trabajos electrofisiológicos realizados en diferentes estructuras nerviosas de tortugas, como grupo representativo de reptiles, lo que favorece la comparación de nuestros resultados con lo observado por otros autores. D) Muchas especies de reptiles se encuentran en peligro de extinción, por lo que realizar investigaciones que demandan un número (potencialmente elevado) de organismos solo aceleraría el proceso de extinción de las mismas. Afortunadamente las especies de tortugas que se utilizaron para la realización de los experimentos son muy abundantes, y no se encuentran en peligro de extinción. Se utilizaron tortugas de la especie *Kinosternum irtipes*, adultas, sin distinción de sexo. Se realizó una

disección por semana durante un periodo aproximado de cuatro meses. Las tortugas se adquirieron legalmente al Bioterio de la “Benemérita Universidad Autónoma de Puebla”. El manejo de los animales se llevó de acuerdo a las normas establecidas en la declaración de Helsinki presentadas en el “Handbook for the Use of Animals in Neuroscience Research” por la Sociedad de Neurociencias (SfN, 1991).

## **Dissección del cerebro de rata**

Se utilizaron ratas albinas Wistar, de 150-200 g, machos. Previo a cualquier manipulación experimental los animales fueron anestesiados con éter, y posteriormente se decapitaron para extraer el cerebro, el cual fue seccionado en cortes coronales con un espesor de 350  $\mu\text{m}$  obtenidos con un vibratomo. Las rebanadas fueron sumergidas inmediatamente en solución salina fría (en mM): 126.0, NaCl; 3.0, KCl; 1.0,  $\text{MgCl}_2$ ; 2.0,  $\text{CaCl}_2$ ; 25.0,  $\text{NaHCO}_3$ ; y 11.0 glucosa; la solución fue saturada con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  (pH 7.4) (Hernández - López et al, 2000) (Fig. 8).

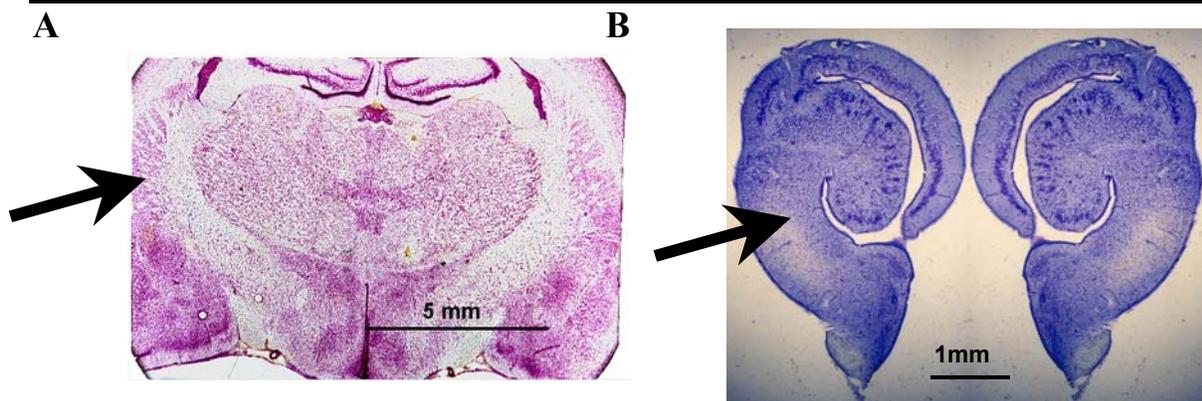
## **Dissección del cerebro de tortuga**

Después de anestesiarse a la tortuga con pentobarbital (100 mg/kg i.p), el cerebro fue removido, y fijado en una película de agar para la obtención de las rebanadas, las cuales fueron cortes coronales de los cerebros con un espesor de 300-500  $\mu\text{m}$  obtenidas a baja temperatura (Fig. 8). Estas se obtuvieron con ayuda de un vibratomo, y se sumergieron en solución salina fría (en mM): 120.0, NaCl; 5.0, KCl; 2.0,  $\text{MgCl}_2$ ; 3.0,  $\text{CaCl}_2$ ; 15.0,  $\text{NaHCO}_3$ ; y 20.0 glucosa, pH 7.4; la solución fue saturada con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  (Delgado-Lezama et al, 1999; Hounsgaard, 2000). Una vez obtenidas las rebanadas se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente por un periodo de tiempo no menor a 1 hr. Posteriormente las rebanadas se trasladaron a una cámara de

registro. En estas condiciones pudieron ser obtenidos registros hasta tres días después de haber realizado la disección (Hounsgaard, 2002). La velocidad de la perfusión fue un flujo constante de  $2.0 \pm 0.5$  ml/min de solución salina a una temperatura de 32-34 °C para los cerebros de mamíferos, en el caso de reptiles se mantuvieron a temperatura ambiente.

## **Sistema de Registro Intracelular**

Los registros intracelulares, en la modalidad de fijación de corriente, se realizaron en el cerebro de tortuga en el área identificada como *Paleostriatum augmentatum* que de acuerdo al atlas estereotáxico (Powers y Reiner, 1980) corresponde al estriado dorsal de los mamíferos (Fig.8). Para el registro intracelular se utilizaron microelectrodos llenos de acetato de potasio (3 M) con biocitina (1-2 %) (Horikawa y Armstrong, 1988). Se utilizaron microelectrodos cuya resistencia osciló entre 70 y 130 M $\Omega$ . Los registros se obtuvieron con un amplificador de alta impedancia (Neuro-Data IR-183), en la modalidad de fijación de corriente. A través del electrodo de registro se inyectaron pulsos de corriente de diferente duración y amplitud generados por un estimulador (Grass Instruments S88) y disparados por una unidad de aislamiento (Digitimer LTD. DS2A). Con la inyección de corriente directa continua se mantuvo el potencial de membrana en los niveles requeridos (Perez-Garci, 2003). Los registros se digitalizaron y se almacenaron en vídeo (40 kHz) para su posterior análisis.



**FIGURA 8. REBANADAS DE CEREBRO.** A) Se muestra un corte coronal de cerebro de rata (WKY) (tomado de Paxinos y Watson, 1998), donde se aprecia claramente el estriado (Flechas), núcleo donde se realizaron los registros electrofisiológicos. B) Corte coronal de cerebro de tortuga realizado en el laboratorio. Ambas rebanadas fueron teñidas con la técnica de Nissl.

---

## Caracterización electrofisiológica

Las curvas I-V se obtuvieron estimulando a la célula con pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades, registrándose la respuesta en trazos de voltaje, asimismo con la inyección de corriente directa continua se mantuvo un potencial de membrana de -80 mV durante este protocolo, para observar el fenómeno de rectificación, producido por corrientes de potasio que son activadas a este potencial de membrana.

Para la obtención de las curvas I-F la célula se estimuló con pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades, registrándose para cada uno de ellos la respuesta en trazos de voltaje (trenes de potenciales de acción), para este protocolo la célula se mantuvo en un potencial de membrana de -60 mV, con

el objeto de que se activaran las corrientes de calcio subumbrales involucradas en el disparo repetitivo de las células. Tanto las curvas I-V como las curvas I-F se obtuvieron en condiciones control (en ausencia de cualquier fármaco).

Asimismo se realizaron curvas I-V e I-F en las NEM's del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga con soluciones salinas diferentes, de esta manera se logró un cambio total del líquido en el medio de perfusión para realizar los registros en una misma neurona, se utilizó primero la solución salina empleada en los registros electrofisiológicos del cerebro de rata (Hernández -López et al, 2000) y posteriormente la solución salina empleada en trabajos electrofisiológicos del cerebro de tortuga (Delgado et al, 1999; Hounsgaard, 2002) (indicadas anteriormente en este trabajo en los apartados correspondientes).

Para estudiar la respuesta moduladora de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 sobre el disparo repetitivo de las NEM's se realizaron curvas I-F, primeramente en condiciones control y posteriormente en presencia de los agonistas selectivos para receptores dopaminérgicos de la familia D1 (6 CIPB 2  $\mu$ M) y para receptores dopaminérgicos de la familia D2 (Quinelorane 10  $\mu$ M), los cuales se agregaron al medio de perfusión por separado.

Por otro lado, la caracterización del efecto modulador de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 sobre la meseta de calcio de las NEM's, que se activa a potenciales subumbral, se realizó inyectando pequeños pulsos de

corriente despolarizante de corta duración a potenciales despolarizantes cercanos al umbral.

## **Morfología de las neuronas estriatales**

Al finalizar los registros electrofisiológicos las neuronas se llenaron con biocitina (1-2%) mediante pulsos hiperpolarizantes de baja intensidad, durante 20 a 30 minutos aproximadamente, posteriormente las neuronas se fijaron en paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1% en buffer salino de fosfatos, pH 7.3 (PBS) toda la noche. Las rebanadas se incluyeron en agar al 6 % y se seccionaron en otras más delgadas con un grosor de 80  $\mu\text{m}$  con ayuda de un vibratomo, posteriormente se colectaron en PBS enjuagándose varias veces antes de continuar. Las rebanadas se incubaron con peróxido de hidrógeno durante 15 minutos aproximadamente y después se enjuagaron con PBS durante 1 hr. Posteriormente se incubaron con el complejo avidina-biotina (ABC) conjugado con peroxidasa de rábano durante 4-6 hrs aproximadamente. Las rebanadas se lavaron con PBS y después se revelaron con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno en tris buffer salino 0.15 M, posteriormente se lavó muy bien con PBS para detener la reacción (Horikawa y Armstrong, 1988). Por último las rebanadas se aclararon y se montaron en portaobjetos para su observación en un microscopio de luz, así las neuronas marcadas se caracterizaron morfológicamente midiendo la longitud del soma (diámetro mayor-diámetro menor), tamaño de los árboles dendríticos y ramificaciones principales.

## **Fármacos**

Agonista del receptor dopaminérgico D2: Quinelorane (10  $\mu$ M, RBI-Sigma).

Agonista del receptor dopaminérgico D1: 6 CIPB (2  $\mu$ M RBI-Sigma).

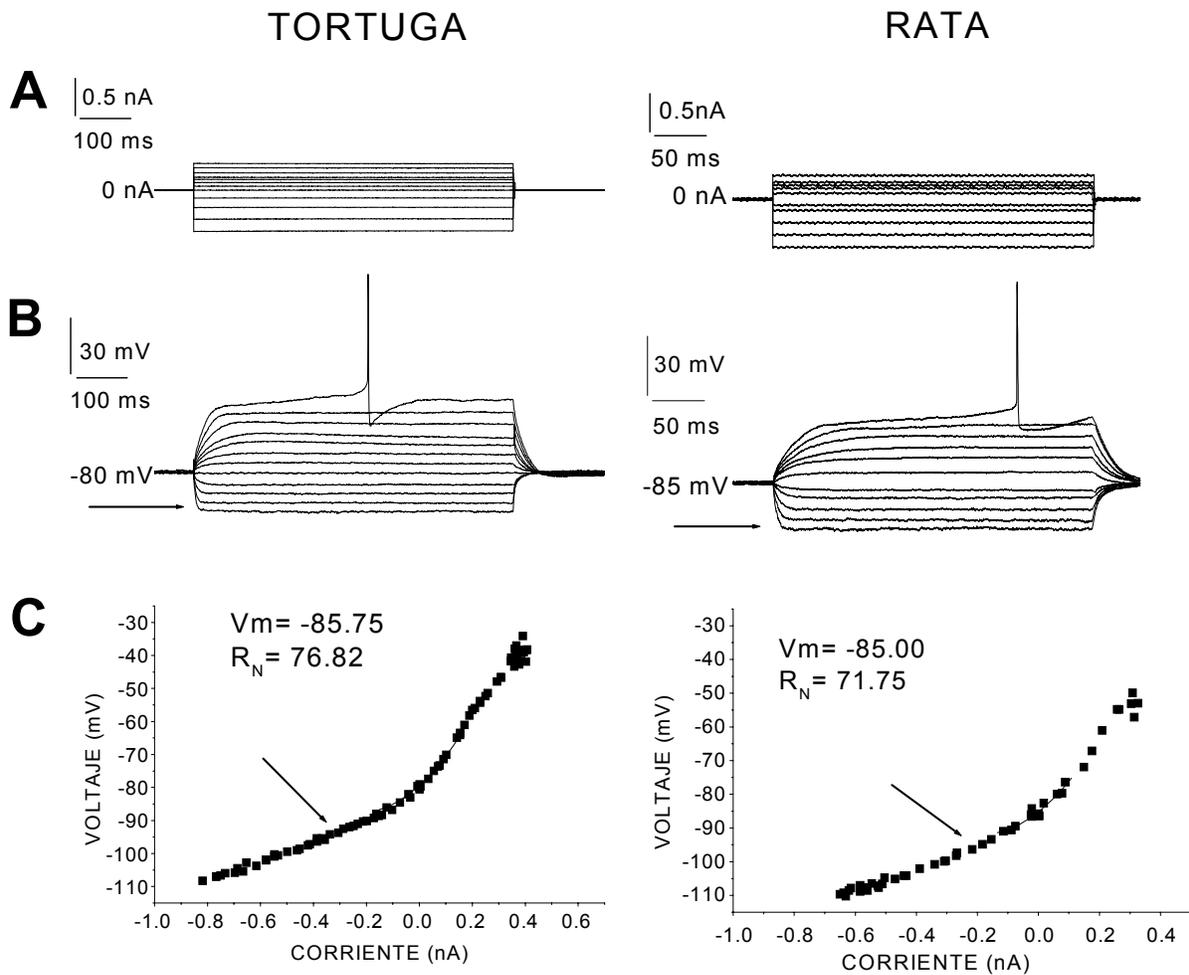
## **Análisis de datos**

El ajuste que fue aplicado a las curvas Intensidad-Voltaje fue un polinomio de segundo grado, mientras que para las curvas Intensidad-Frecuencia el ajuste fue de tipo sigmoideal. La frecuencia inicial de los potenciales de acción se calculó a partir del promedio de la frecuencia de las dos primeras espigas y la frecuencia final del promedio de las cuatro últimas, asimismo para reportar su diferencia significativa con respecto al control, a la curva I-F se le aplicó la prueba estadística *t* de Student para datos pareados. Para los parámetros electrofisiológicos y morfológicos se reportaron medias y errores estándar.

## RESULTADOS

### Caracterización electrofisiológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga

En la figura 9 se muestran los trazos de voltaje en respuesta a pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades. Como se puede observar las curvas intensidad-voltaje son muy similares en ambos organismos exhibiendo bastante rectificación a un potencial aproximado de -80 mV. En mamíferos se ha reportado que esto se debe a la activación de conductancias ( $K_{ir}$ ) de potasio (Galarraga et al, 1994 y Nisenbaum y Wilson, 1995), impidiendo que el potencial de la membrana se haga más negativo conforme aumentan los pulsos de corriente hiperpolarizante, sin embargo, este fenómeno es un poco más pronunciado en la tortuga que en la rata. Asimismo cuando fueron inyectados pulsos de corriente despolarizante todas las NEM's, tanto de tortuga como de rata respondieron con un incremento gradual tipo rampa en el potencial de la membrana con un marcado retraso en la aparición del potencial de acción. Tanto en mamíferos como en aves se ha reportado que esta característica se debe a la activación de corrientes de potasio tipo A sensibles a 4-aminopiridina (Bargas et al, 1989 y Farries and Perkel, 2000), sin embargo habría que corroborar que están participando estas corrientes en reptiles, que es lo más probable, pues se sabe que estas corrientes también están involucradas en la adaptación de las espigas, fenómeno observado en la tortuga.

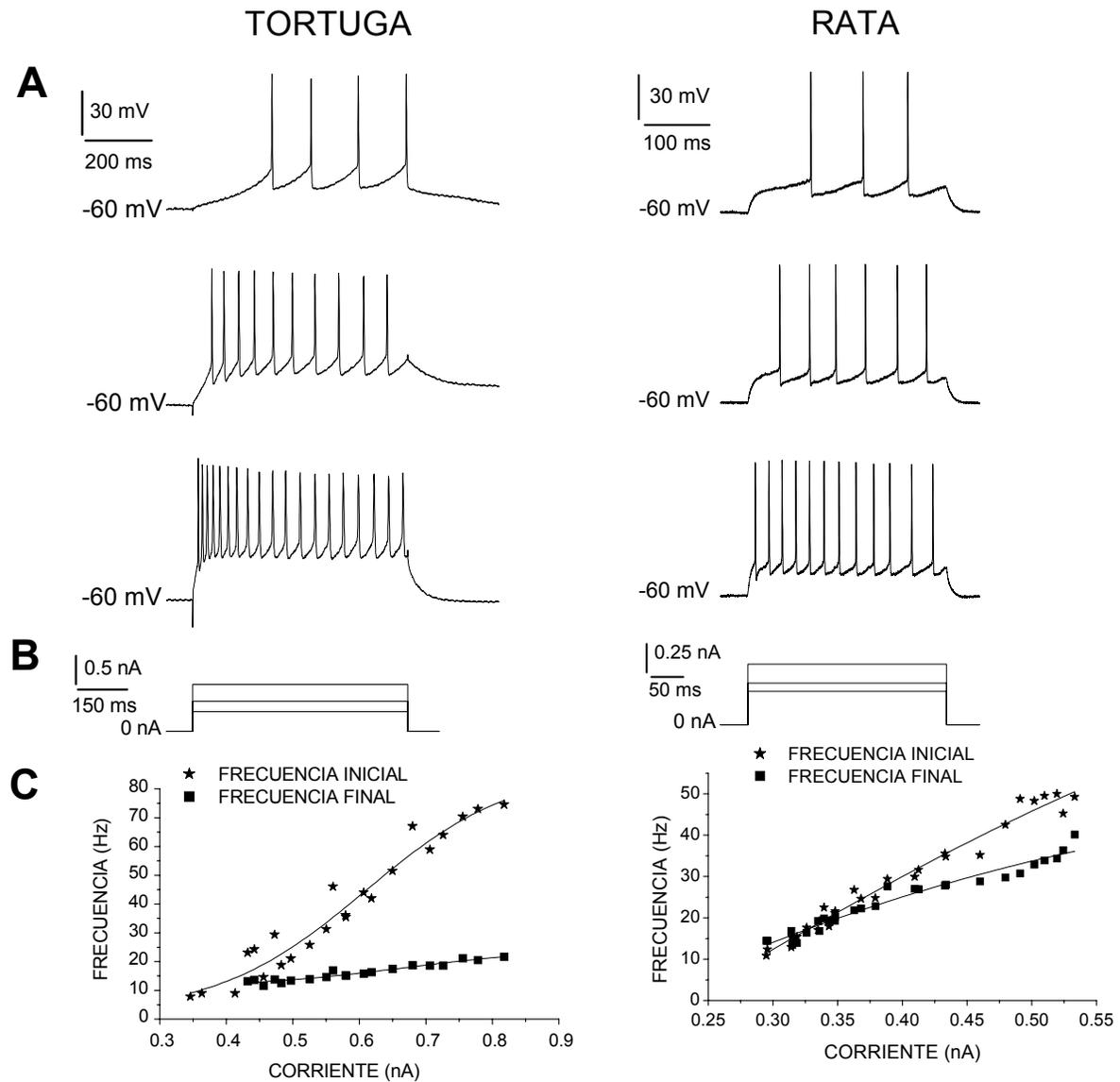


**FIGURA 9. Curva Intensidad-Voltaje de las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de tortuga y el neostriado de rata. A) Trazos de voltaje de una NEM en respuesta a pulsos de corriente. B) Pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades aplicados con un potencial de mantenimiento de -80 mV para la tortuga y -85 mV para la rata. C) Se muestra la relación Intensidad-Voltaje tomada en la parte estable del registro, en la parte superior izquierda de la gráfica se muestran los valores correspondientes al potencial de la membrana ( $V_m$ ) y la resistencia de entrada ( $R_N$ ). Las flechas indican el fenómeno de rectificación.**

En la figura 10 se muestran trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de 3 pulsos de corriente despolarizante de diferente intensidad, así como la relación intensidad-frecuencia en las NEM's tanto de rata como de tortuga; se puede apreciar bastante similitud en el patrón de disparo de las neuronas de ambos organismos, sin embargo hay ligeramente una mayor adaptación en la tortuga que en la rata así como una aparente disminución de la corriente  $I_A$  de potasio que retrasa la aparición de los potenciales de acción.

En general los parámetros electrofisiológicos de las NEM'S medidos se agrupan en la tabla I. Se observa que el potencial de reposo se presenta mucho más despolarizado en la tortuga que en la rata (-63 y -85 mV respectivamente) lo que hasta el momento nos permite pensar que el potencial de reposo se debe probablemente a las diferentes concentraciones de potasio, asimismo el potencial umbral (potencial de membrana donde se genera el potencial de acción) es mucho más despolarizado en tortuga (-32 mV) que en rata (-45 mV) encontrándose gran similitud con lo reportado para este parámetro en aves (-34 mV), de acuerdo a esta característica serían necesarias entradas excitatorias corticales más fuertes para alcanzar el umbral de disparo en las espinosas medianas de tortuga y ave. La resistencia de entrada resultó mayor en la tortuga (152 M $\Omega$ ) que en la rata (50 M $\Omega$ ), aunque este parámetro varía de acuerdo a la técnica de registro empleada. Este dato podría apoyarse en el hecho de que el soma es ligeramente menor en la tortuga que en la rata. Otra característica importante es la latencia de la primera espiga, es decir, el tiempo que tarda en disparar el primer potencial de acción

después de inyectar corriente despolarizante por encima del umbral, siendo similares en tortuga (336 ms) y en rata (324 ms).



**FIGURA 10. Frecuencia de disparo de las neuronas espinosas mediananas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga y del neostriado de rata. A) Cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción como respuesta a los diferentes pulsos de estimulación, a un potencial de mantenimiento de -60 mV. B) Pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades aplicados. C) Curva Intensidad-Frecuencia donde se grafica la frecuencia inicial y final del tren de potenciales de acción.**

**TABLA I.**  
**Características Electrofisiológicas de las Neuronas Espinosas**  
**Medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la Tortuga y el**  
**Neostriado de la Rata**

<b>PARÁMETROS ELECTROFISIOLÓGICOS</b>	<b>TORTUGA</b>	<b>RATA</b>
Potencial de Membrana (mV)	-63.13 ± 2.07 <sup>(a)</sup>	-85.8 ± 0.5
Umbral de disparo (mV)	-32.54 ± 1.55	-45 ± 0.5
Latencia de Disparo (ms)	336.53 ± 30.18	324.6 ± 22
Amplitud del Potencial de Acción (mV)	49.67 ± 1.37	72.7 ± 0.7
Duración del Potencial de Acción (ms)	4.28 ± 0.49	1.97 ± 0.15
Amplitud del Pospotencial (mV)	15.05 ± 0.83	5.61 ± 1.6
Duración del pospotencial (ms)	185.82 ± 20.89	148 ± 18.7
dV/dt Subida del Potencial de Acción (V/s)	38.77 ± 6.28	284 ± 43.6
dV/dt Bajada del Potencial de Acción (V/s)	22.23 ± 4.48	61.2 ± 11.5
Resistencia de Entrada (MΩ)	152.44 ± 15.74	50.3 ± 1.4

a) media ± S.E.M (n=15).

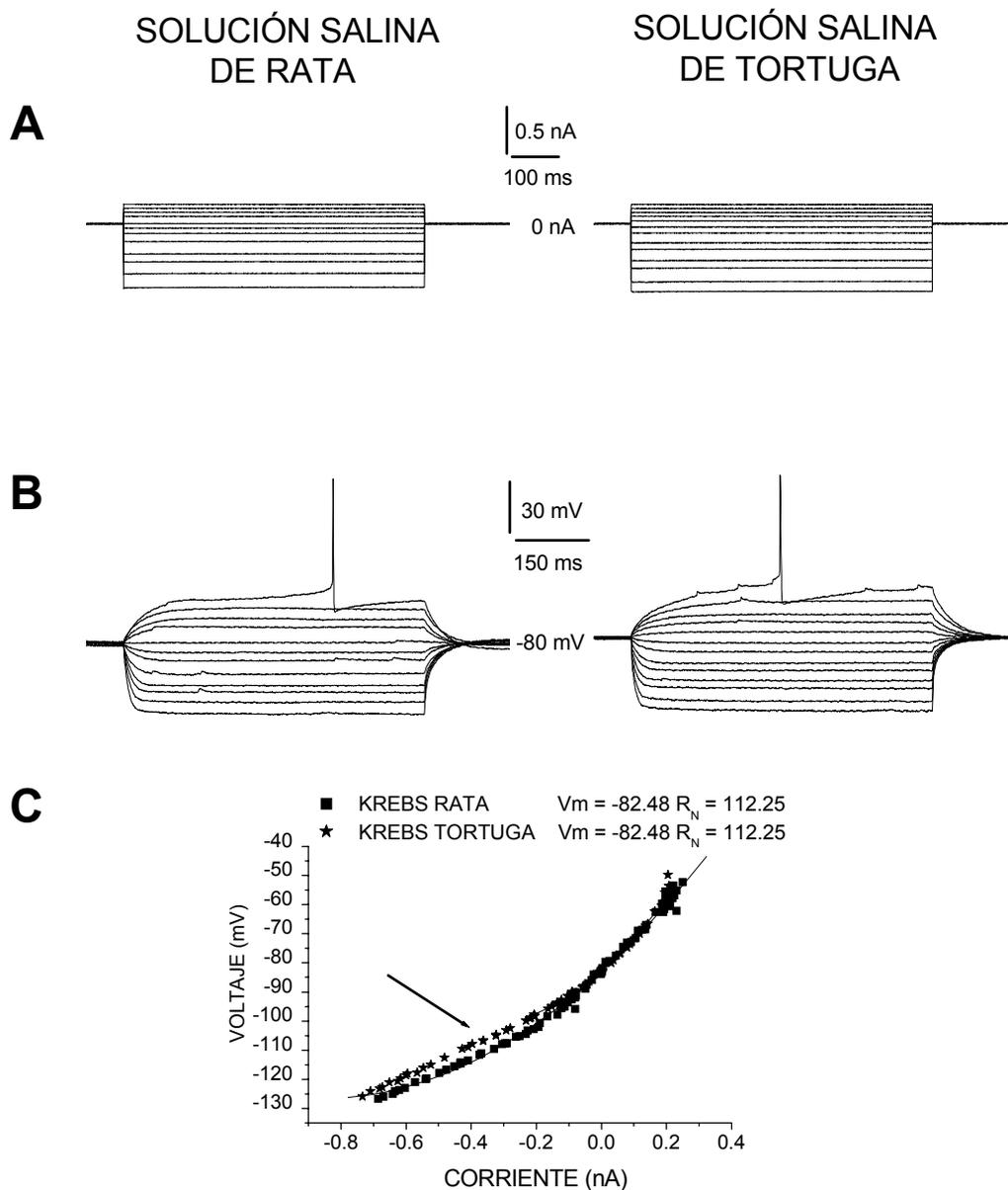
Con la finalidad de comprobar si las diferencias en los parámetros electrofisiológicos encontrados entre las NEM's de tortuga y rata no se debían a las diferencias en las concentraciones iónicas de la soluciones salinas utilizadas, se realizaron curvas intensidad-voltaje así como curvas intensidad-frecuencia en una misma NEM de tortuga, en las diferentes soluciones salinas. En las figuras 11 y 12 se muestran estos protocolos experimentales como resultados preliminares de esta propuesta (n=3 ).

Las curvas I-V, mostradas en la figura 11, presentan una mayor rectificación en la solución salina de tortuga que de rata, debido probablemente a una concentración mayor de potasio, asimismo en los trazos de voltaje en presencia de solución salina de tortuga se observan ligeras protuberancias subumbrales en el potencial de la membrana y un ligero aumento en la duración del potencial de acción, que podrían deberse a una mayor concentración de calcio en solución salina de tortuga, ambas curvas se realizaron en la misma neurona.

En la figura 12 se presentan las curvas I-F donde se puede apreciar claramente que en la misma neurona, en presencia de la solución salina de tortuga, la amplitud del potencial de acción disminuye considerablemente, asimismo se observan las protuberancias en el potencial de la membrana y el ensanchamiento de la espiga observadas en la curva I-V.

### **Caracterización morfológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga.**

En la figura 13 en A, E y F se muestran las fotografías de algunas neuronas espinosas medianas de tortuga visualizadas después de haber realizado los registros electrofisiológicos. Notese que todas las neuronas espinosas medianas presentan una gran densidad de espinas en sus árboles dendríticos (B); éstos últimos presentan pocas ramificaciones, cubriendo un área aproximada de 400  $\mu\text{m}$ , entre las células registradas en C y D se aprecia la presencia de una neurona estriatal no espinosa, cuyos datos electrofisiológicos no se consideran para este



**FIGURA 11. Curva Intensidad-Voltaje de las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de tortuga en presencia de solución salina de rata y solución salina de tortuga. A) Pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades aplicados. B) Trazos de voltaje de esta neurona en respuestas a pulsos de corriente (mostrados en con un potencial de mantenimiento de -80 mV. C) Se muestra la relación Intensidad-Voltaje tomada en la parte estable del registro, en la parte superior de la gráfica se muestran los valores correspondientes al potencial de la membrana ( $V_m$ ) y la resistencia de entrada ( $R_N$ ), la flecha indica en la rectificación bajo las dos condiciones experimentales.**

trabajo por tratarse probablemente de una interneurona. Asimismo en esta galería de fotografías se presenta un acople entre dos NEM's (F), que fue observado después de haber realizado los registros electrofisiológicos con el agonista D2, Quinelorane.

En la tabla II muestra los parámetros morfológicos que se midieron en las neuronas registradas y marcadas con biocitina. En ellas se observa que las NEM's de tortuga presentan aparentemente menor densidad de espinas dendríticas y se encuentran menos ramificadas que las NEM's de rata. El soma fue ligeramente menor y la extensión del árbol dendrítico fue ligeramente mayor en la tortuga que en la rata, superando los 400  $\mu\text{m}$  de diámetro en la tortuga.

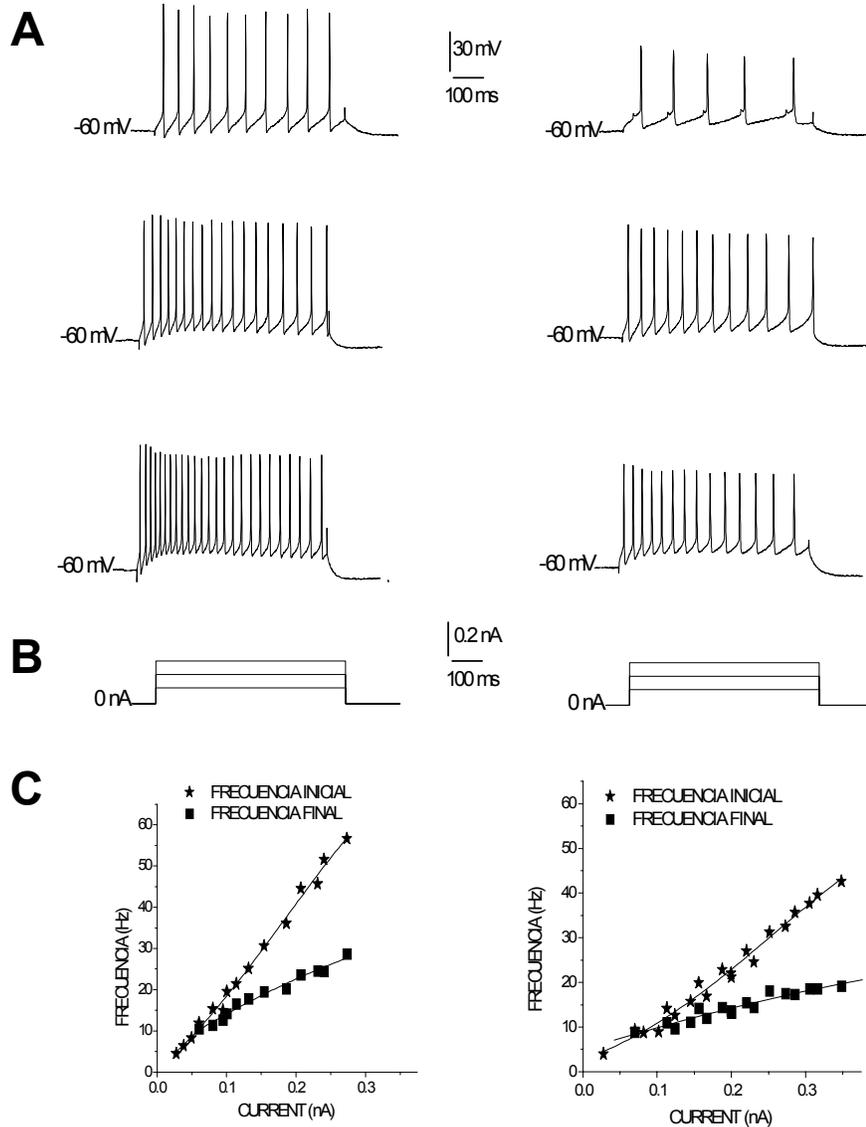
**TABLA II**  
**Características Morfológicas de las Neuronas Espinosas**  
**Medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la Tortuga y el**  
**Neostriado de la Rata**

PARÁMETROS MORFOLÓGICOS	RATA	TORTUGA
Soma		
Diámetro Mayor ( $\mu\text{m}$ )	17.6 $\pm$ 0.68 <sup>(a)</sup>	12.8 $\pm$ 1.49
Diámetro Menor ( $\mu\text{m}$ )	15.0 $\pm$ 1.34	9.4 $\pm$ 0.87
Árbol Dendrítico		
Diámetro Mayor ( $\mu\text{m}$ )	364 $\pm$ 12.42	406.67 $\pm$ 58.93
Diámetro Menor ( $\mu\text{m}$ )	271 $\pm$ 28.00	295.67 $\pm$ 39.18
Número de Espinas Dendríticas <sup>(b)</sup>	34.25 $\pm$ 2.08	26 $\pm$ 1.0

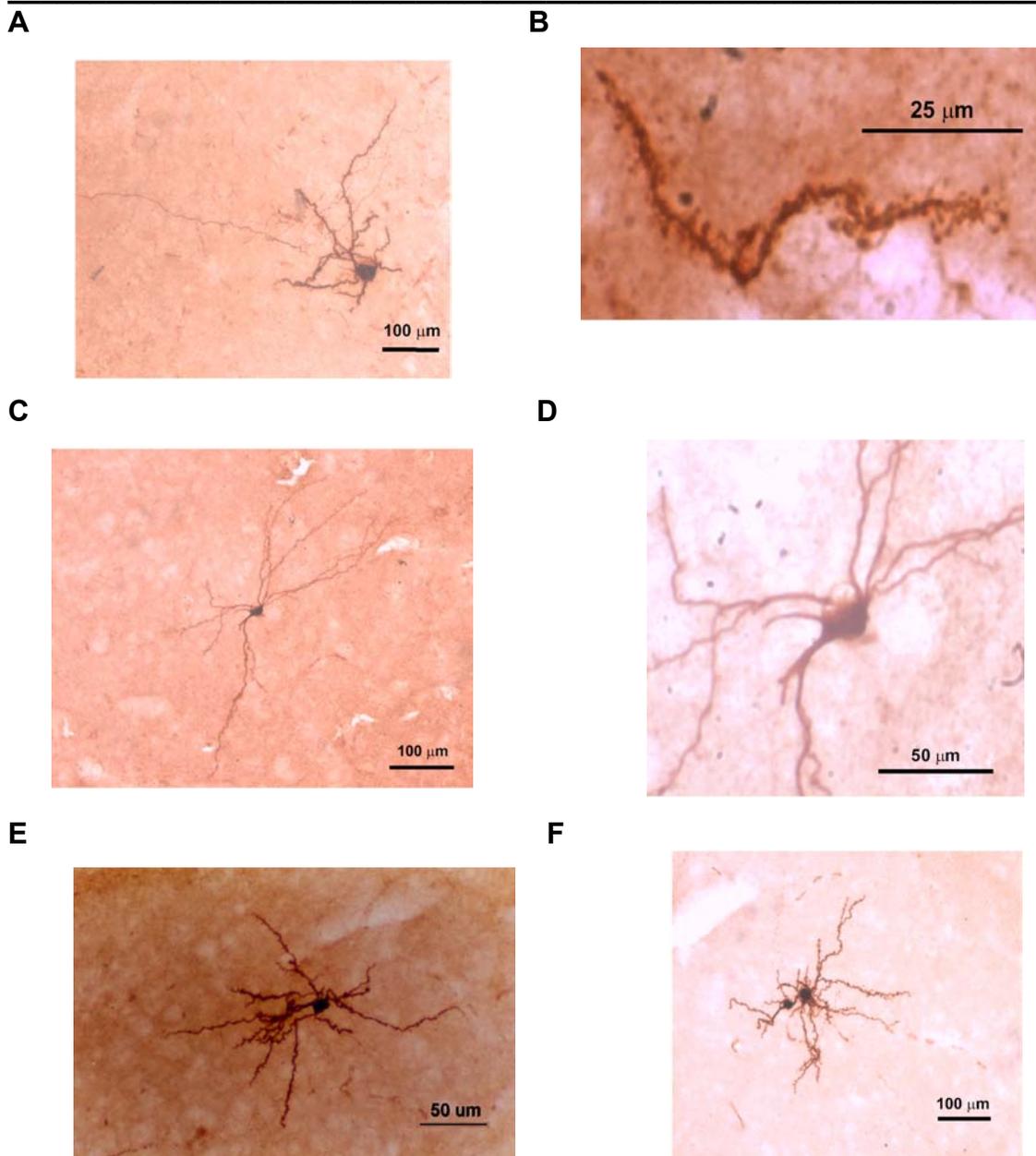
(a) Media  $\pm$  S.E.M.

(b) Intervalo de 30  $\mu\text{m}$  [terciarias (rata) y finales (tortuga)]

SOLUCIÓN SALINA DE RATA    SOLUCIÓN SALINA DE TORTUGA



**FIGURA 12.** Frecuencia de disparo de las neuronas espinosas mediananas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga en presencia de solución salina de rata y solución salina de tortuga. A) Cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción como respuesta a los diferentes pulsos de estimulación, a un potencial de mantenimiento de -60 mV. B) Pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades aplicados. C) Curva Intensidad-Frecuencia, donde se grafica la frecuencia inicial y final del tren de potenciales de acción. Los registros bajo ambas condiciones se realizaron en la misma neurona.



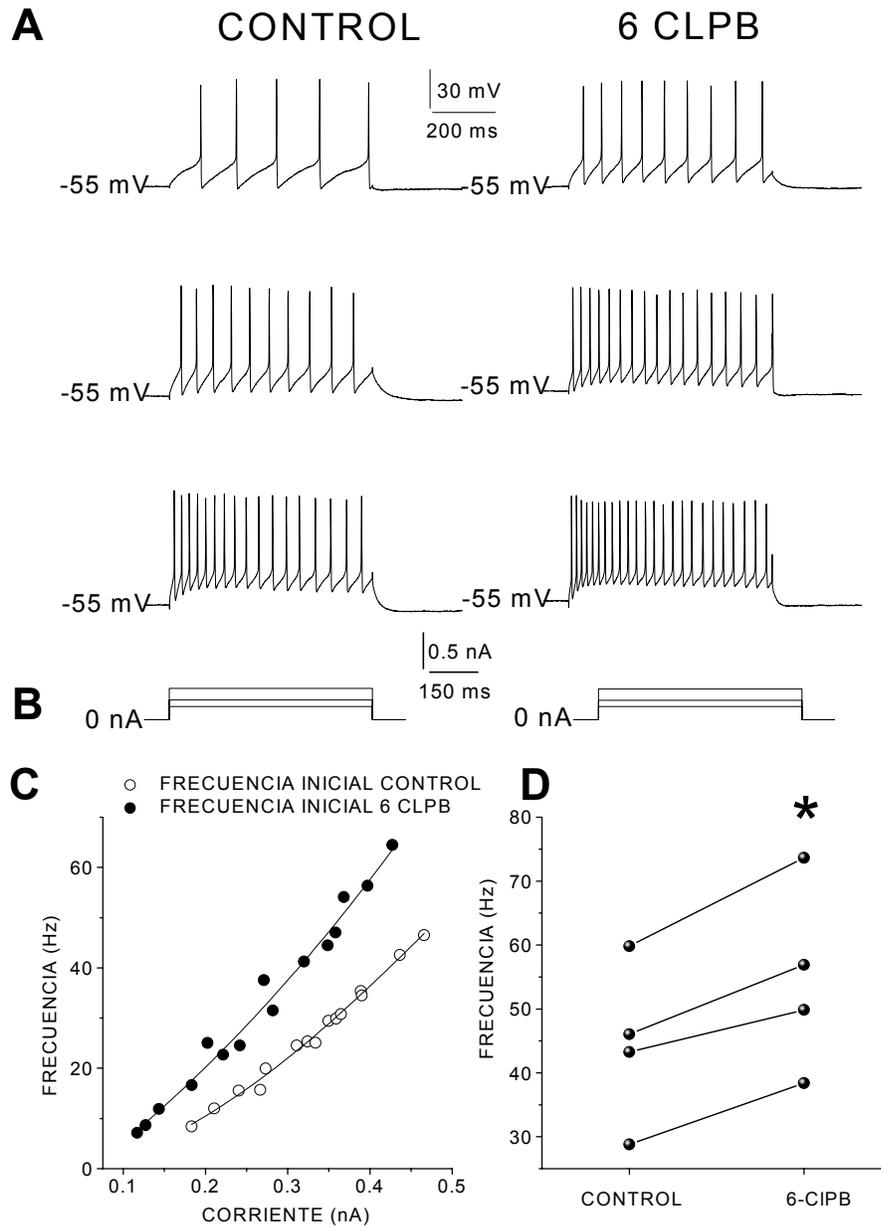
**FIGURA 13. Identificación morfológica de las neuronas registradas electrofisiológicamente en el *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga.** A) Neurona espinosa mediana, observada con el aumento de 10X, está célula es donde se realizó el registro electrofisiológico con el agonista D1, 6 CIPB, representado en el apartado de resultados. B) Acercamiento de las espinas dendríticas de la NEM, observado con el aumento de 40X. C) Neurona estriatal no espinosa, aumento 10X D) Acercamiento de la neurona no espinosa, visualizada con el aumento de 40X. E) Neurona espinosa mediana, observada con el aumento de 10X. F) Acople de dos NEM's. Es en esta célula donde se realizó el registro electrofisiológico con el agonista D2, Quinelorane, mostrado en resultados. Todas las neuronas fueron visualizadas con la técnica biocitina-avidina-biocitina (ABC) conjugado a peroxidasa.

## **Modulación en la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2.**

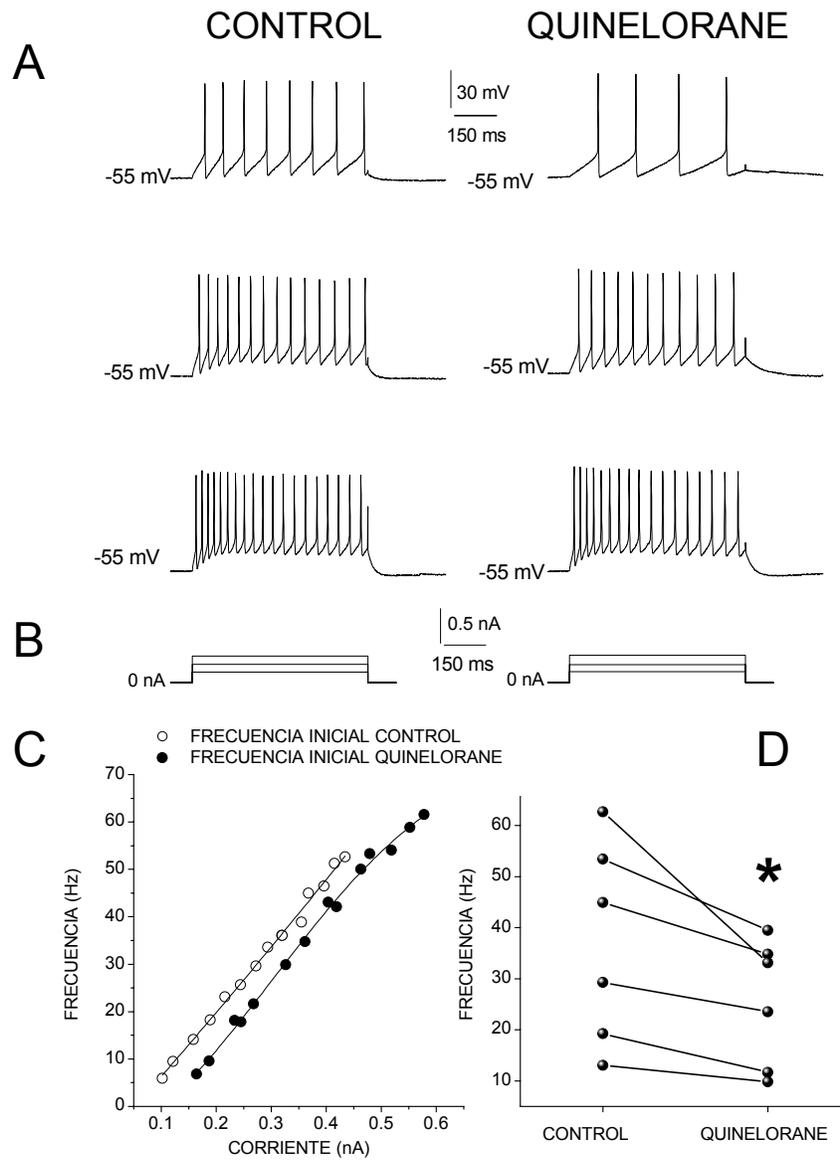
En la figura 14 se muestran trenes de potenciales de acción ante la inyección de 3 pulsos de corriente despolarizante de diferente intensidad así como la relación intensidad-frecuencia tanto en situación control como en presencia de 6 CIPB 2  $\mu$ M, se puede observar claramente que este agonista dopaminérgico tipo D1 provocó un incremento en la frecuencia de disparo en un  $23.81 \pm 3.69$  % con respecto al control ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ,  $t$  de Student) tanto en la inicial como en la final.

Por otro lado el agonista dopaminérgico tipo D2 (Quinelorane 10  $\mu$ M) produjo una disminución en la frecuencia de disparo de la NEM en un  $29.94 \pm 4.41$  % ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ,  $t$  de Student) con respecto al control, provocando un corrimiento de la curva hacia la derecha, esto se representa en la figura 15.

Estos resultados sobre la modulación de disparo de las NEM's por activación de ambos receptores dopaminérgicos son muy similares a los reportados para aves y mamíferos (Hernández-López et al, 1997; Ding y Perkel, 2002 y Pérez- Garci, 2003)



**FIGURA 14. Modulación de la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas mediana del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga por el agonista D1 6 CIPB.** A) Cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción como respuesta a los diferentes pulsos de estimulación, a un potencial de mantenimiento de -60 mV. B) Pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades aplicados. C) Curva Intensidad-Frecuencia donde se grafica la frecuencia inicial del tren de potenciales de acción. D) Gráfica de líneas pareadas que muestra el cambio de frecuencia en diferentes células medido en la I-F media de toda la muestra antes y después de aplicar el agonista D1. \* Datos significativos con respecto al control.

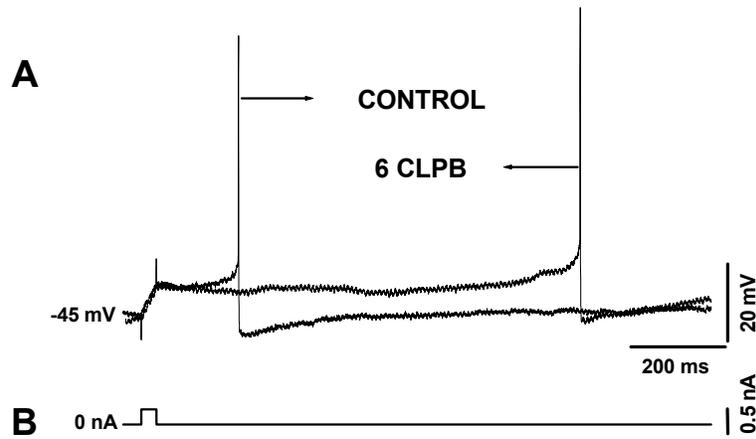


**FIGURA 15. Modulación de la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga por el agonista D2 quinolorane. A) Cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción como respuesta a los diferentes pulsos de estimulación, a un potencial de mantenimiento de -60 mV. B) Pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades aplicados. C) Curva Intensidad-Frecuencia donde se grafica la frecuencia inicial del tren de potenciales de acción. D) Gráfica de líneas pareadas que muestra el cambio de frecuencia en diferentes células medido en la I-F media de toda la muestra antes y después de aplicar el agonista D2.\* Datos significativos con respecto al control.**

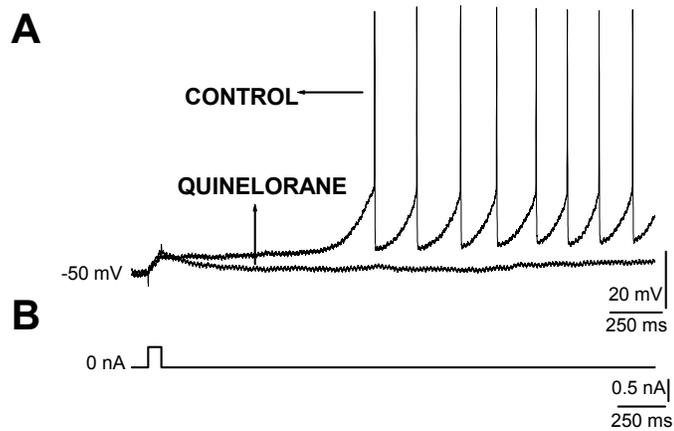
## **Modulación de la meseta de calcio en las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2.**

Debido a que la entrada de calcio al interior de la NEM juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo (Galarraga et al, 1989), del mismo modo se ha reportado en mamíferos que la activación de receptores D1 y D2 modulan la frecuencia de disparo principalmente promoviendo e inhibiendo respectivamente la generación de mesetas despolarizantes prolongadas (cientos de milisegundos), mediadas principalmente por conductancias de calcio tipo L, cuando el potencial de membrana se mantiene a niveles despolarizados ( $> -60$  mV) (Hernández-López et al, 1997 y Pérez- Garci, 2003), en este trabajo se decidió verificar si en la modulación de la frecuencia de disparo de las NEM's de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 también están participando las conductancias de calcio tipo L.

Como se muestra en la figura 16 el agonista D1 aumenta la probabilidad de aparición y duración de la meseta de calcio con respecto al control (n=6), un efecto contrario es producido por el agonista D2 que reduce la meseta de calcio (n=4), lo cual es mostrado en la figura 17. Tales resultados son reportados también para mamíferos (Hernández-López et al, 1997 y Pérez- Garci, 2003), lo que nos permite inferir que probablemente los receptores dopaminérgicos D1 y D2 también en tortuga modulan la frecuencia de disparo de las NEM's a través de la regulación de las conductancias tipo L.



**FIGURA 16. Modulación de la meseta de calcio las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga por el agonista D1 6-CIPB. A) Meseta de calcio en condición control y en presencia del agonista D1 a un potencial de mantenimiento de -45 mV. B) Pulso de corriente despolarizante aplicado.**



**FIGURA 17. Modulación de la meseta de calcio las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga por el agonista D2, quinolorane. A) Meseta de calcio en condición control y en presencia del agonista D2 a un potencial de mantenimiento de -50 mV. B) Pulso de corriente despolarizante aplicado.**



## **DISCUSIÓN**

En el presente trabajo se muestra por primera vez el registro electrofisiológico de neuronas de los ganglios basales de reptiles. Esto resulta de gran importancia, pues desde un punto de vista evolutivo las estructuras nerviosas del cerebro de mamífero se originaron de ancestros reptiles, así como de otros más antiguos. Por otro lado, los datos electrofisiológicos arrojados por este trabajo corroboran los datos neuroanatómicos e histoquímicos (Kiehn et al, 1992, Marin et al, 1997; 1998, Medina y Reiner 1995; 1997, Reiner et al, 1983; 1984; 1998, Richfield et al, 1987, Smeets 1992, Smeets y González 2000, Smeets et al, 2003) que plantean la similitud existente entre los ganglios basales de los amniotas, sugiriendo que el estriado juega el mismo papel en las funciones motoras de reptiles, aves y mamíferos.

### **Caracterización electrofisiológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga**

Los resultados obtenidos en reptiles mostraron mucha similitud con las NEM's de mamífero, tanto en sus propiedades electrofisiológicas como en la modulación funcional ejercida por el circuito dopaminérgico, esto nos permite sugerir que la función motora de este núcleo (el estriado) ya estaba establecida desde los primeros reptiles y que el proceso más crucial, entonces, para el incremento en el repertorio de las conductas motoras que permitieron el éxito biológico de los mamíferos fue la aparición de la neocorteza, lo cual enriqueció la

integración y complejidad del comportamiento motor de estos organismos (Reiner et al,1984).

Por otro lado, los protocolos electrofisiológicos mostraron bastante similitud entre reptiles y mamíferos, sin embargo, los parámetros electrofisiológicos que observamos de las neuronas espinosas medianas de tortuga son más similares a los reportados para aves que con los descritos en mamíferos (Farries y Perkel, 2000; Pineda, 1995), lo que nos permite suponer que la evolución de la de las funciones motoras moduladas por el estriado ocurrió de manera gradual y que las diferencias son mayores de aves a mamíferos que de reptiles a aves.

La gran similitud entre las NEM's de reptil y mamífero, como se ha mencionado anteriormente, nos permiten suponer la alta conservación funcional de los ganglios basales entre los amniotas, sin embargo esto no implica que la electrofisiología de estas neuronas sea idéntica.

Probablemente las pequeñas diferencias encontradas en los parámetros electrofisiológicos podrían explicarse debido a las diferentes concentraciones iónicas de las soluciones salinas utilizadas en los trabajos electrofisiológicos del cerebro de tortuga con respecto a las utilizadas en la rata, pues se ha visto que la alteración de algunas conductancias iónicas afectan las propiedades electrofisiológicas de las neuronas. Se ha reportado en algunos trabajos que los parámetros electrotónicos de las neuronas neostriatales cambian en función de la concentración de potasio, por ejemplo el bloqueo o variación en la concentración

de este ion en el medio extracelular afecta algunas propiedades activas y pasivas de las neuronas como la constante de tiempo de la membrana, la resistencia de entrada, el umbral de disparo y el potencial de reposo entre otros parámetros (Bargas et al, 1988 y Reyes et al, 1998), pues modifica la dinámica de algunas conductancias de potasio dependientes de voltaje. A este respecto se pueden explicar las pequeñas diferencias encontradas en la duración del pospotencial hiperpolarizante (AHP), y la rectificación anómala entre tortuga y rata, ya que estas características están moduladas por las conductancias de potasio y en la solución salina de tortuga la concentración de este ion es más elevada que en la de rata (Pacheco-Cano et al, 1996)

Por otro lado, otra conductancia de gran importancia para la regulación de las propiedades de disparo de las neuronas son las corrientes de calcio (Galárraga et al, 1989 y Pérez-Garci, 2003), otro ión alterado en la solución salina de tortuga (mayor en la solución salina de tortuga que en la solución salina de rata). Se ha visto que en las dendritas de las neuronas hay una gran densidad de canales de calcio que permiten la generación de potenciales dendríticos, estos potenciales de calcio que presentan alto umbral, larga duración y baja amplitud, viajan electroticamente hacia el soma observándose en un registro intracelular somático como potenciales muy pequeños y en ocasiones como pequeñas protuberancias (Llinás y Sugimori, 1980a y b), muy probablemente estas son las protuberancias o potenciales dendríticos, debido al incremento de calcio, observados en las curvas I-V e I-F de tortuga sobre el potencial de membrana.

Por otro lado, la amplitud del potencial de acción disminuye y la duración del mismo aumenta ligeramente en la solución salina de tortuga, lo que nos permite sugerir que la diferencia de estos parámetros entre tortuga y rata se deben probablemente a las diferentes soluciones salinas utilizadas, esto es apoyado por el hecho de que el calcio modula estas propiedades de disparo de la neurona.

### **Caracterización morfológica de las neuronas espinosas medianas de tortuga**

Aunque la morfología de las NEM's de tortuga es muy similar a las NEM's de rata, tienen más similitud con las NEM's de aves, pues el soma en estos organismos también es más pequeño que en la rata ( $9.3 \mu\text{m}$  vs  $15 \mu\text{m}$ ) y el árbol dendrítico es mayor alcanzando a cubrir hasta un área de  $1 \text{ mm}$  (Farries y Perkel, 2000). Es importante mencionar que Bennett y Wilson (2000) reportan un diámetro de  $300$  a  $500 \mu\text{m}$  para el árbol dendrítico de la NEM de rata. En el presente trabajo el tamaño del árbol dendrítico observado en el estriado de la rata fue de  $364 \mu\text{m}$  ( $n=8$ ), siendo ligeramente menor que el árbol dendrítico de la tortuga ( $406 \mu\text{m}$ ), sin embargo podemos observar que probablemente no es una diferencia significativa, pues según Bennett y Wilson, este valor cae dentro del rango para los encontrados en la rata, ya que las NEM's de rata tienen un árbol dendrítico de amplitud variable.

La mayor densidad de espinas que presentan las NEM's de rata probablemente se deben a una mayor cantidad de contactos sinápticos

provenientes de las entradas, tegmentales, corticales y talámicas, este idea es apoyada por el hecho de que a través de la evolución los mamíferos desarrollaron su primordio cortical transformándolo en una neocorteza de seis capas, la cual suministra de mayores entradas excitatorias al estriado, permitiendo a su vez que haya una mayor integración del circuito motor, lo cual repercute también en una mayor entrada talámica hacia el estriado (Reiner et al, 1984 y 1998; Smeets et al, 2000).

### **Modulación en la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2**

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue el determinar que tan conservado se encontraba la función motora entre los amniotas estudiando funcionalmente el circuito dopaminérgico, en relación a su modulación sobre la frecuencia de disparo de las NEM's por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Los resultados mostraron que no hay cambios aparentes en el efecto de estos receptores entre reptiles, aves (Farries y Perkel, 2000) y mamíferos. Este hecho corrobora los estudios anatómicos que han sugerido que el circuito sináptico en los ganglios basales, y en particular el sistema dopaminérgico, está altamente conservado entre todos los cordados (Reiner et al, 1998), lo cual nos permite sugerir que las funciones motoras entre los amniotas se han conservado a lo largo de la evolución.

En este trabajo se observó el mismo efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 sobre la frecuencia de disparo de las NEM's de la rata (Hernández-Lopez et al, 1997; 2000; Misale et al, 1998; Nicola et al, 2000; Pérez-Garci, 2003) con lo observado en este trabajo en las NEM's de la tortuga. El incremento de la frecuencia de disparo por la activación de los agonistas D1 fue mayor en la rata (Pérez-Garci, 2003) que en la tortuga (34% vs 23% respectivamente), de la misma manera se reporta un mayor decremento en la frecuencia de disparo por los agonistas D2 en la rata que en la tortuga (39% vs 29% respectivamente), probablemente esto se debe a que hay una mayor densidad de receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la rata que en la tortuga.

### **Modulación en la meseta de calcio las neuronas espinosas medianas de tortuga por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2**

Muy posiblemente las conductancias involucradas en la modulación dopaminérgica de los amiotas son las mismas, siendo una de las más importantes las conductancias de calcio, pues como se ve en los resultados hay una modulación de las mesetas de calcio por la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2, reproduciéndose el mismo efecto que se ha reportado para mamíferos (Pérez-Garci et al, 2003) en las tortugas. Sin embargo, en aves no se ha visto la participación que tienen las conductancias de calcio, una diferencia importante en la modulación de la frecuencia de disparo por activación de los receptores D1 entre aves y mamíferos, es que en aves aumenta la

excitabilidad de la NEM, aún en potenciales hiperpolarizados (Ding y Perkel, 2002), mientras que en mamífero no sucede esto (Hernández-López et al, 1997). En tortuga, habría que verificar si este efecto del D1 se repite a potenciales de membrana hiperpolarizados, y poder explorar que otras conductancias a este potencial de membrana están actuando para modular la frecuencia de las NEM's.

De esta manera, los resultados mostrados en el presente trabajo nos permiten sugerir la idea general de que el efecto modulador de la excitabilidad de las NEM's del estriado por activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 es similar en los amniotas y por lo tanto que la inervación dopaminérgica es un mecanismo de modulación estriatal altamente conservado en estos organismos.

Lo anterior reafirma la idea de que la evolución de los ganglios basales pudo haberse dado en diversas etapas a lo largo de la evolución de los vertebrados y que aunque durante este proceso la integración de la información fue haciéndose más compleja, repercutiendo en las funciones motoras, el papel funcional de la inervación dopaminérgica ya estaba establecido desde los primeros amniotas. Aparentemente el principal detonador del desarrollo de los ganglios basales ocurrió en la transición del medio acuático al medio terrestre, es decir en la transición entre anfibios y reptiles (Marín et al 1997; 1998; Reiner et al, 1998). La causa de ello, sería que el desarrollo de conductas locomotoras en el medio ambiente acuático se encuentra muy limitado, si lo comparamos con la gran diversidad de patrones conductuales de los animales terrestres. Por lo que habría que verificar si esta modulación dopaminérgica no cambia en la transición

evolutiva de anamniotas a amniotas, realizando estos experimentos en los organismos filogenéticamente inferiores más próximos, los anfibios.

## CONCLUSIONES

- En general los parámetros electrofisiológicos de las neuronas espinosas medianas del *Paleostriatum augmentatum* de reptiles y del neostriado de mamíferos fueron muy similares, corroborando así los datos neuroanatómicos e histoquímicos que plantean bastante similitud entre los circuitos sinápticos de ganglios basales de los amniotas.
- Algunas de las pequeñas diferencias electrofisiológicas encontradas entre las neuronas espinosas medianas de reptiles y mamíferos probablemente pueden explicarse a las diferencias en las concentraciones iónicas de las soluciones salinas utilizadas para los registros electrofisiológicos, dos conductancias iónicas de gran importancia que podrían estar involucradas principalmente en la alteración de estas propiedades electrofisiológicas son las conductancias de potasio y de calcio.
- La morfología de las NEM's de tortuga fue muy parecida a las NEM's de rata, sin embargo, entre las pequeñas diferencias se encontró que el soma de las NEM's de tortuga fue menor, el árbol dendrítico presentó menos ramificaciones con una extensión ligeramente mayor, presentando una menor densidad de espinas que las NEM's de rata.
- El receptor dopaminérgico D1 aumentó la frecuencia de disparo de la NEM del *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga en un  $23.81 \pm 3.69$  % (n=4, p<0.05, t

de Student), mientras que la activación del receptor D2 la disminuyó en un  $29.94 \pm 4.41$  % (n=6,  $p < 0.05$ ,  $t$  de Student). Esta modulación muy probablemente involucra las conductancias de calcio tipo L, al igual que en mamíferos, pues el agonista D1 aumentó la meseta de calcio de la NEM, contrario al efecto provocado por el agonista D2, ya que este último la disminuyó.

- En general, los resultados electrofisiológicos arrojados por este trabajo nos permiten apoyar la idea de que la inervación dopaminérgica modula las funciones motoras por activación de los receptores D1 y D2 de la misma forma en todos los amniotas. Los ganglios basales de dichos organismos no sólo han conservado fuertemente la integridad del circuito sináptico, sino también los diferentes aspectos funcionales de los mismos.

## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
AchE	Acetilcolinesterasa
ADVR	Cresta ventricular anterior-dorsal
AF	Interneuronas de disparo rápido sin espinas
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CHAT	Colin-acetiltransferasa
DA	Dopamina
DARP-32	Fosfoproteína de 32 KD regulada por AMPc-DA
DVR	Cresta ventricular dorsal
ENK	Encefalinas
FS	Interneuronas de disparo rápido
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GB	Ganglios Basales
LA	Interneuronas de pospotencial grande
LPO	Lóbulo paraolfatorio
LTS	Interneuronas con espigas de bajo umbral
MOR	Receptores a opiáceos tipo $\mu$
NEM's	Neuronas espinosas medianas
NMDA	N-metil-D-aspartato
PA	Paleostriatum augmentatum
PCL	Fosfolipasa C
PI	Fosfatidil-inositol
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PP-1	Proteína fosfatasa 1
SNc	Susbtancia nigra pars compacta
SNr	Susbtancia nigra pars reticulata
SP	Susbtancia P
TM	Dominio transmembranal
VTA	Área tegmental ventral

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS*, 12:366-375.
- 2.- Aizman O, Brismar H, Uhlén PP, Zettergren E, Levey A, Forsberg H, Greengard P and Aperia A (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nature Neurosci*, 3: 226-230.
- 3.- Bargas J, Galarraga E y Aceves J (1988). Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp Brain Res*, 72:390-398.
- 4.- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res*, 75(1):146-156.
- 5.- Barral, J. (2001). Modulación Presináptica de las aferentes excitatorias Glutamatérgicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. UNAM. Facultad de Ciencias. México de D.F. Pp. 82.
- 6.- Bartol SM, Musick JA, Ochs AL (2002) Visual acuity thresholds of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): an electrophysiological approach. *J Comp Physiol [A]*, 187:953-960.
- 7.- Barretta S, Sachs Z, Graybiel AM (1999). Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D2-class receptor blockade. *Eur J Neurosci*, 11:4309-4319.
- 8.- Bennett DB, y Wilson CJ (2000). Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: *Brain dynamics and striatal complex*, eds. Miller R y Wickens JR, pp 111-140. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- 9.- Blanton, M. G, J. J. Lo Turco, et al. (1989). "Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex." *J Neurosci Methods*, 30(3): 203-10.
- 10.- Blanton, M. G, J. J. Lo Turco, et al. (1990). "Endogenous neurotransmitter activates N-methyl-D-aspartate receptors on differentiating neurons in embryonic cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(20): 8027-30.
- 11.- Blanton, M. G. and A. R. Kriegstein (1991). "Spontaneous action potential activity and synaptic currents in the embryonic turtle cerebral cortex." *J Neurosci*, 11(12): 3907-23.
- 12.- Cepeda C, Chandler SH, Shumate MW y Levine MS (1995). Persistent Na<sup>+</sup> conductance in medium-sized neostriatal neurons: characterization using infrared videomicroscopy and whole cell patch-clamp recordings. *J Neurophysiol*, 74: 1343-1348.
- 13.- Chesselet M-F y Delfs JM (1996). Basal ganglia and movement disorders: an update. *TINS*, 19 (10): 417-422.
- 14.- Civelli O, Bunzow JR and Grandy DK (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 32: 281-307.
- 15.- David DJ and Harrison MB (2002). Colocalization of dopaminergic and muscarinic receptor subtypes on medium spiny striatal neurons in the rat. Program No 63.1. 2002. Abstrac Viewer/Itinerary planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. CD-ROM.

- 16.- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Bates MD y Caron MG (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*, 347: 72-76.
- 17.- Delgado-Lezama R, Perrier JF, Hounsgaard J (1999) Local facilitation of plateau potentials in dendrites of turtle motoneurons by synaptic activation of metabotropic receptors. *J Physiol*, 515:203-207.
- 18.- Di Marzo V, Vial D, Sokoloff P, Schwartz J.-C y Piomelli D (1993). Selection of alternative Gi-mediated signaling pathways at the dopamine D2 receptor by protein kinase. *C J Neurosci*, 13: 4846-4853.
- 19.- Ding L and Perkel D (2002). Dopamine modulates excitability of spiny neurons in the avian basal ganglia. *J Neuroscience*, 22(12): 5210-5218.
- 20.- Farries MA, Perkel DJ (2000). Electrophysiological properties of avian basal ganglia neurons recorded *In Vitro*. *J Neurophysiol*, 84:2502-2513.
- 21.- Flaherty AW y Graybiel AM (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol*, 66:1249-1263.
- 22.- Fooreman MM, Fuller RW, Hynes MD, Gidda JS, Nichols CL, Schaus JM, Kornfeld EC y Clemens JA (1989). Preclinical studies on quinelorane, a potent and highly selective D2-dopaminergic agonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 250: 227:235.
- 23.- Fraser C (1989). Site-directed mutagenesis  $\beta$  adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 264: 9266-9270.
- 24.- Gabbiani F, Midtgaard J, Knopfel T (1994) Synaptic integration in a model of cerebellar granule cells. *J Neurophysiol*, 72:999-1009.
- 25.- Galarraga E, Bargas J, Sierra A y Aceves J (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res*, 75:157-168.
- 26.- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández y Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res*, 100: 239-249.
- 27.- Gerfen C.R (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci*, 15: 285-320.
- 28.- Gingrich JA y Caron MG (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci*, 16: 299-321.
- 29.- Giros BP, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ y Schwartz JC (1989). Alternative splicing directs the expressions of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature*, 342: 923-926.
- 30.- Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-Atc4 in hippocampal neurons. *Nature*, 401:703-708.
- 31.- Graybiel, A.M. (1990b) Neurotransmitters and neuromodulation in the basal ganglia. *TINS* 13: 244-253
- 32.- Greengard P, Nairn CA, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen BP, Fienberg A y Nishi A (1998). The DARP-327protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Rev*, 26: 274-284.
- 33.- Greengard P, Allen PB y Nairn CA (1999). Beyond the dopamine receptor: the DARP-327protein phosphates-1 cascade. *Neuron*, 23: 435-447.
- 34.- Guertin PA, Hounsgaard J (1998) NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol*, 80:3380-3382.
- 35.- Guertin PA, Hounsgaard J (1999) L-type calcium channels but not N-methyl-D-aspartate receptor channels mediate rhythmic activity induced by

- cholinergic agonist in motoneurons from turtle spinal cord slices. *Neurosci Lett*, 261:81-84.
- 36.- Henselmans JM, Hoogland PV y Stoof JC (1991). Differences in the regulation of acetylcholine release upon D2 dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor activation between the striatal complex of reptiles and the neostriatum of rats. *Brain Res*, 566(1-2): 8-12.
  - 37.- Hernández -López S,argas J, Surmeier DJ, Reyes A and Galarraga E (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-Type  $Ca^{2+}$  conductance. *J Neuroscience*, 17: 3334-3342.
  - 38.- Hernández -López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E,argas J, Hamm H and Surmeier DJ (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-Type  $Ca^{2+}$  current and excitability through a novel PLC 1/IP3/calcineurina signaling cascade. *J Neurosci*, 20: 8987-8985.
  - 39.- Hibert, MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A y Hoflack J (1992). Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*, 40: 8-15.
  - 40.- Hibert, MF, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J y Bruinvels A (1993). This is not a G protein-coupled receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 14: 7-12.
  - 41.- Horikawa K, Armstrong WE (1988). A versatile means of intracellular labeling: Injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods*, 25:1-11.
  - 42.- Horstman DA, Brandon S, Wilson A, Guyer C, Cragoe E y Limbird L. An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of  $\alpha 2$  adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem*, 265: 21590-21595.
  - 43.- Hounsgaard J (2002) Motoneurons do what motoneurons have to do. *J Physiol*, 538:400.
  - 44.- Kandel ER, Scheartz JH y Jessell TM (2000). Principles of neural science. 4a ed. Mc Graw Hill. E.U.A, pp.
  - 45.- Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci*, 13: 4908-4923.
  - 46.- Keabian JW and Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277: 93-96.
  - 47.- Keifer J, Vyas D, Houk JC, Berrebi AS, Mugnaini E (1992) Evidence for GABAergic interneurons in the red nucleus of the painted turtle. *Synapse*, 11:197-213.
  - 48.- Kiehn O, Rostrup E, Moller M (1992) Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. *J Comp Neurol*, 325:527-547.
  - 49.- Kröner S, Gottmann K, Hatt H, Güntürkün O (2002) Electrophysiological and morphological properties of cell types in the chick neostriatum caudolaterale. *Neurosci*, 110:459-473.
  - 50.- Lajiness ME, Chio CL, Huff RM (1993). D2 dopamine receptor stimulation of mitogenesis in transfected Chinese hamster ovary cells: relationship to dopamine stimulation of tyrosine phosphorylations. *J Pharmacol Exp Ther*, 267:1573-1581.
  - 51.- Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R y Bloch B (1990). Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 230-234.

- 52.- Llinás R y Sugimori M (1980<sup>a</sup>). Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J of Physiol*, 305:197-213.
- 53.- Llinás R y Sugimori M (1980<sup>a</sup>). Electrophysiological properties of *in vitro* Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J of Physiol*, 305:171-195.
- 54.- Louis E, Degli Esposti Boschi C, Ortega G, Andreu E, Fernandez E, Sanchez-Andres JV (2002) Effects of fluctuations on electrical properties of gap-junction connected cells in the turtle retina. *Neurosci Lett*, 323:21-24.
- 55.- Lukyanetz EA, Piper TP, Sihra TS (1998). Calcineurin involvement in the regulation of high-threshold Ca<sup>2+</sup> channels in NG108-15 (rodent neuroblastoma x glioma hybrid) cells. *J Physiol (Lond)*, 510: 371-385.
- 56.- Magill PJ, Bolam P y Bevan MD (2000). Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci*, 20: 820-833.
- 57.- Marin O, Smeets W, González A (1997). Basal ganglia organization in amphibians: catecholaminergic innervation of the striatum and nucleus Accumbens. *J. Comp. Neurol*, 378:50-69.
- 58.- Marin O, Smeets W, González A (1998). Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS*, 21:487-494.
- 59.- McDonagh JC, Gorman RB, Gilliam EE, Hornby TG, Reinking RM, Stuart DG (1999) Electrophysiological and morphological properties of neurons in the ventral horn of the turtle spinal cord. *J Physiol Paris*, 93:3-16.
- 60.- Medina L, Reiner A (1995). Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: implications for the evolution of the basal ganglia. *Brain Behav Evol*, 46: 235-258.
- 61.- Medina L, Reiner A (1997). The efferent projections of the dorsal and ventral pallidal parts of the pigeon basal ganglia, studied with biotinylated dextran amine. *Neuroscience*, 81: 773-802.
- 62.- Mermelstein PJ, Foehring RC, Tkatch T, Song WJ, Baranauskas G y Surmeier DJ (1999). Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with  $\beta$  subunit expression. *J Neurosci*, 19: 7268-7277.
- 63.- Milton SL y Lutz PL (1998). Low extracellular dopamine levels are maintained in the anoxic turtle (*Trachemys scripta*) striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(7):803-807.
- 64.- Missale C, Russel N, Robinson SW, Jaber M and Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78:189-225.
- 65.- Monsma FJ, Barton AC y Sibley DR (1990). Expresión of functional D2 dopamine receptors following differentiation of Y-79 human retinoblastoma cells. *J Neurochem*, 54: 1200-1207.
- 66.- Nauta W.J.H. y V.B. Domesick (1984). Afferente and Efferent relationships of the basal ganglia. In: Pitman (Ed) *The functions of the basal ganglia*. CIBA foundation symposium 107. London. pp 3-29.
- 67.- Neve KA, Cx BA, Henningsen AR, Spanoyannis A y Neve RL (1983). Pivotal role for aspartate-80 in the regulation of dopamine D2 receptor affinity for drugs and inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, 39: 733-739.
- 68.- Nicola S.M, Surmeier D.J y Malenka R.C (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*, 23: 185-215.

- 69.- Nishi A, Snyder GL y Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci*, 17: 8147-8155.
- 70.- Nisenbaum ES, Mermelstein PG, Wilson CJ y Surmeier DJ (1998). Selective blockade of a slowly inactivating potassium current in striatal neurons by ( $\pm$ ) 6 chloro-APB hydrobromide (SKF82958). *Synapse*, 29: 213-224.
- 71.- Nisenbaum ES y Wilson CJ (1995). The role of potassium currents in the subthreshold responses of neostriatal spiny projection neurons. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 165-181. Austin, TX: Landes.
- 72.- Northcutt RG (1981). Evolution of the telencephalon in non-mammals. *Ann Rev Neurosci*, 4:301-350.
- 73.- O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ y Bouvier RJ (1989). Palmitoylation of the human  $\beta$ 2 adrenergic receptors: mutation of CYS 341 in the carboxy tail leads to an uncoupled, non-palmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem*, 264: 7564-7569.
- 74.- Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D y Galárraga E (1996). Inhibitory actions of dopamine involve a subthreshold  $\text{Cs}^+$ -sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res*, 110:205-211.
- 75.- Pérez-García E (2003). Caracterización de la modulación del patrón de disparo de la neurona espinosa mediana del neostriado, por la activación del receptor dopaminérgico tipo D2. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 86 pp.
- 76.- Perrier JF, Hounsgaard J (1999a)  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated nonselective current ( $I_{\text{CAN}}$ ) in turtle motoneurons. *J Neurophysiol*, 82:730-735.
- 77.- Perrier JF, Hounsgaard J (1999b)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated non selective cationic current ( $I_{\text{CAN}}$ ) in turtle motoneurons. *J Neurophysiol*, 82:730-735.
- 78.- Pineda JC (1995). El pospotencial hiperpolarizante y las corrientes de potasio en las neuronas neostriatales de la rata: Un ejemplo de modulación colinérgica. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 115 pp.
- 79.- Pough FH, Janis CM, Heiser JB (1999). *Vertebrate life*, 5 Edition: Prentice Hall.
- 80.- Powers AS, Reiner A (1980) A stereotaxic atlas of the forebrain and midbrain of the eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). *J Hirnforschung*, 21:125-159.
- 81.- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J y Sealfon SC (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol*, 11: 1-20.
- 82.- Redgrave P, Prescott T and Gurney K (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem?. *Neuroscience*, 89:1009-1023.
- 83.- Reiner A, H. J. Karten y A.R Solina (1983) Substance P: Localization within paleostriatal-tegmental pathways in the pigeon. *Neurosci*, 0:61-85.
- 84.- Reiner A, Brauth SE, Karten HJ (1984). Evolution of the amniote basal ganglia. *TINS*, 7:320-325.
- 85.- Reiner A, Medina L, Veenman CL (1998). Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev*, 28:235-285.
- 86.- Reiner A, Stern EA, y Wilson CJ (2001). Physiology and morphology of intratelencephalically projecting corticostriatal-type neurons in pigeon as revealed by intracellular recording and cell filling. *Brain Behav Evol*, 58:101-114.

- 87.- Reyes A, Galarraga E, Flores-Hernández J, Tapia D y Bargas J (1998). Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp Brain Res*, 120:70-84.
- 88.- Richfield EK, Young AB, Penney JB (1984). Comparative distribution of dopamine D1 and D2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats and monkeys. *J Comp Neurol*, 262(3):446-463.
- 89.- Schinelli SM, Paolillo M y Corona GL (1994). Opposing actions of D1-and D2-receptors on arachidonic acid release and cyclic AMP production in striatal neurons. *J Neurochem*, 62: 944-949.
- 90.- Shen, JM and. Kriegstein AR (1986). "Turtle hippocampal cortex contains distinct cell types, burst-firing neurons, and an epileptogenic subfield." *J Neurophysiol*, 56(6): 1626-49.
- 91.- Smeets WJ. (1992). Comparative aspects of basal forebrain organization in vertebrates. *Eur J Morphol*, 30(1):23-36.
- 92.- Smeets W and González A (2000) Catecholamine system in the brain of vertebrates: New perspectives through a comparative approach. *Brain Res Rev*, 33:308-379.
- 93.- Smeets W, Marín O and González A (2000). Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anal*, 196: 501-517.
- 94.- Smeets WJ, Lopez JM, Gonzalez A. (2003) Immunohistochemical localization of DARPP-32 in the brain of the turtle, *Pseudemys scripta elegans*: further assessment of its relationship with dopaminergic systems in reptiles. *J Chem Neuroanat*, 25(2):83-95.
- 95.- SfN (Society for Neuroscience) 1991. Handbook for the Use of Animals in Neuroscience Research. Washington, D.C.: SfN, WWW:<http://www.sfn.org/handbook/>
- 96.- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML y Schwartz JC (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347: 146-151.
- 97.- Sokoloff P y Schwartz JC (1995). Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci*, 16: 270-275.
- 98.- Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS y Dixon RAF (1989). Identification of serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 264: 13478-13572.
- 99.- Strange PG (1993). Dopamine receptors: structure and function. *Prog Brain Res*, 99: 167-179.
- 100.- Sunahara RK, Guan HC, O'dowd BF, Seeman P, Laurier LG, NG G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM y Niznik HB. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 650: 614-619.
- 101.- Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS y Ariano MA (1993). Are Neostriatal dopamine receptors colocalized?. *Trends Neurosci*, 16: 299-305.
- 102.- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC y Greengard P (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14: 385-397.
- 103.- Surmeier DJ, Song WJ, y Yan Z (1996). Coordinated Expresión of dopamine receptors in neostriatal neurons. *J Neurosci*, 16: 6579-6591.
- 104.- Striedter GF (1997) The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol*, 49:179-213.

- 105.- Tomic, Seeman MP, George SR y O'Dowd B(1993). Dopamine D1 receptor mutagenesis: role of amino acids in agonist and antagonist binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 191: 1020-1027.
- 106.- Usiello A, Baik J, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV y Borrelli E (2000). Distinct functions of two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408: 199-203.
- 107.- Vallone D, Picetti R y Borrelli E (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Bio Rev*, 24: 125-132.
- 108.- Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB y Civelli O (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with higher affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350: 610-614.
- 109.- Van Tol HHM, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB y Jovanovic V (1992). Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature*, 358: 149-152.
- 110.- Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Herve P y Vicent JD (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the biogenic amine receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, 16:375-381.
- 111.- Vitanova L, Kuppenova P, Haverkamp S, Popova E., Mitova L. y Wassle H (2001) Immunocytochemical and electrophysiological characterization of GABA receptors in the frog and turtle retina. *Vision Res*, 41:691-704.
- 112.- Wilson, C (1998) The Basal ganglia. IN: Shepherd, G.M (Ed) *The synaptic organization of the brain*. 4a Ed. Oxford University press. N.Y. pp 329-375.
- 113.- Yan Z, y Surmeier DJ (1997). D5 dopamine receptors enhance Zn<sup>2+</sup>-sensitive GABA<sub>A</sub> currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron*, 19: 1115-1126.
- 114.- Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HHM, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR y Civelli O (1990). Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptor. *Nature*, 347: 76-80.