



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

*Universidad Nacional Autónoma de México*  
*Facultad de Estudios Profesionales*  
*Iztacala*



*Modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas al  
neocórtex de la rata por la activación de receptores a opiáceos tipo  
delta: Papel de los canales de potasio.*

*T E S I S*

*Que para obtener el título de:*

*B I Ó L O G A*

*Presenta:*

*Cynthia Rodríguez Sánchez*

*Director de Tesis: Jaime Aurelio Barral Caballero*

*Tlalnepantla, Estado de México*

*2005*



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 contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo Proyectos a Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al **Dr. Jaime Barral (IN200703)**.

El trabajo experimental se realizó 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 Abril de 2003 a Octubre de 2004.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del

**Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.**  
**Proyecto Neurociencias U.I.I.C.S.E.**  
**FES Iztacala UNAM.**

## **Agradecimientos**

### **A mi familia:**

**Padres.** A mi madre Yolanda Sánchez de Rodríguez, y a mi padre Leopoldo Bernardo Rodríguez Espinosa, gracias por haber creído en mi y por el apoyo que siempre he tenido de parte de ustedes, gracias por su trabajo, amor y tiempo que me han dedicado para mi crecimiento personal y profesional los amo. Los amo porque me han dado una vida llena de alegría y me han enseñado a valorar y querer a un hijo. Le agradezco a Dios por tenerlos en estos momentos con vida y a mi lado para compartir y disfrutar este trabajo con ustedes.

**Hermanos.** Blanca Rosa, Juan Bernardo, Angie Yolanda, Anel y Patricia, los amo muchísimo y también les doy gracias a todos porque siempre nos hemos apoyado unos a otros, ustedes han puesto un granote de arena a este trabajo y quiero que sepan que estoy orgullosa y muy feliz por tenerlos como mis hermanos.

**A mi Abuelita.** Maria Antonia Espinosa Soto gracias por tu amor, confianza, apoyo y consejos que me diste, así como el tiempo valioso que compartimos juntas te amo.

Y por supuesto a mis **Sobrinos** que me trajeron mas alegría durante mi carrera: Laura Ximena, Carlos Alberto, Alan, Diego y Emmanuel, los amo bebes. .

**A Mis Amigos de Carrera.** Fabiola Oropeza, Manuela Muhlia, Mary Ibarra, Andrea Zamora, Xochilt Jose, Antonio Araujo, Guillermo Jiménez, Samuel Tolentino, José Alamilla; gracias por considerarme como su verdadera amiga y por los momentos felices y difíciles que pasamos juntos, los quiero muchísimo y nunca los olvidare. A mi amigo y novio Alejandro Vega López te agradezco de todo corazón por los tiempos felices que pasamos juntos así como los difíciles que nos hicieron caer y levantarnos para seguir en la lucha constante de vivir la vida, le doy gracias a Dios por haberte puesto en mi camino. A las personas que me apoyaron y animaron al ingreso de mi carrera Angel Delgadillo y Jonathan Pérez.

**A Mis Profesores de Carrera:** En general a todos les agradezco, admiro y felicito por el trabajo y dedicación que le ponen a su trabajo, mediante el cual yo pude aprender y esforzarme cada vez mas a lo largo de la carrera, gracias por el apoyo que tuve de cada uno cuando me fue necesario, felicidades por querer transmitir sus conocimientos y experiencias a todos los alumnos.

*A mi Asesor de Tesis. Jaime Aurelio Barral Caballero, le agradezco tanto en el aspecto académico y personal por brindarme su tiempo y conocimientos durante el desarrollo del presente trabajo y me permito felicitarlo por su trabajo y trayectoria. Gracias por sus consejos y experiencias que me transmitió y compartió conmigo. Le hago de su conocimiento que fue parte importante para que yo pudiera concluir la tesis ya que me dio ánimo en los momentos difíciles, gracias profesor.*

*A Mis Sinodales de Tesis: Dra. Bertha Segura Alegría.*

*M. en C. Mónica González Isais.*

*Dr. Juan Manuel Mancilla.*

*Biol. Hugo J. Castro Cortes. Gracias por haberle dedicado el tiempo necesario a la revisión del presente trabajo, y que de acuerdo con su experiencia decidieron dar por concluida la tesis.*

## **Poesía**

### **Tiempo**

*Sabia virtud de conocer el tiempo  
A tiempo amar y desatarse a tiempo  
Como dice el refrán dar tiempo al tiempo  
Que de amor y dolor alivia el tiempo.*

*Aquel amor a quien amé a destiempo  
Martirizóme tanto y tanto tiempo  
Que no sentí jamás correr el tiempo  
Tan acremente, como en ese tiempo.*

*Amor queriendo, como en otro tiempo  
Ignoraba yo aún que el tiempo es  
Oro ¡hay! cuanto tiempo perdí ¡hay!  
¡Cuánto tiempo!*

*y hoy que de amores ya no tengo tiempo  
amor de aquellos tiempos  
cuanto añoro la dicha inicua  
de perder el tiempo.*

*Renato Leduc*

***Pensamiento***

*Si una montaña se interpone en tu camino, rodéala. Si no puedes rodearla,*

*Pasa por encima. Si no puedes pasar por encima,*

*Detente y pregúntate si vale la pena llegar al otro lado*

*En caso afirmativo cava un túnel.*

*Anónimo*

# Índice

Resumen .....	;	Error! Marcador no definido.
Introducción.....	;	Error! Marcador no definido.
Transmisión sináptica y Neuromodulación.....	;	Error! Marcador no definido.
La Sinapsis Química .....	;	Error! Marcador no definido.
Neurotransmisores .....	;	Error! Marcador no definido.
Neuromoduladores .....	;	Error! Marcador no definido.
Modo de Acción de los neuromoduladores .....	;	Error! Marcador no definido.
Modulación Sináptica .....	;	Error! Marcador no definido.
Modulación Sináptica por canales de Calcio.....	;	Error! Marcador no definido.
Modulación Sináptica por canales de Potasio .....	;	Error! Marcador no definido.
Canales de Potasio en la Terminal Presináptica.....	;	Error! Marcador no definido.
Características de los bloqueadores de los canales de potasio.....	;	Error! Marcador no definido.
Modulación sináptica en el neocórtex de rata.....	;	Error! Marcador no definido.
Papel funcional del neocórtex .....	;	Error! Marcador no definido.
Péptidos Opioides .....	;	Error! Marcador no definido.
Endorfinas .....	;	Error! Marcador no definido.
Enkefalinas.....	;	Error! Marcador no definido.
Dinorfinas .....	;	Error! Marcador no definido.
Receptores a opiáceos .....	;	Error! Marcador no definido.
Receptor $\mu$ .....	;	Error! Marcador no definido.
Receptor Delta $\delta$ .....	;	Error! Marcador no definido.
Receptor Kappa $\kappa$ .....	;	Error! Marcador no definido.
Distribución de los péptidos opioides en el sistema nervioso central. ....	;	Error! Marcador no definido.
Papel funcional de los receptores a opiáceos .....	;	Error! Marcador no definido.
Modulación sináptica por opiáceos .....	;	Error! Marcador no definido.
Objetivos.....	;	Error! Marcador no definido.
Objetivo General.....	;	Error! Marcador no definido.
Objetivos Particulares .....	;	Error! Marcador no definido.
Material y Métodos.....	;	Error! Marcador no definido.
Organismos .....	;	Error! Marcador no definido.
Estimulación y Registro de potenciales de campo .....	;	Error! Marcador no definido.
Potenciales de campo.....	;	Error! Marcador no definido.
Facilitación por pulso pareado. ....	;	Error! Marcador no definido.
Protocolo experimental .....	;	Error! Marcador no definido.
Fármacos Utilizados .....	;	Error! Marcador no definido.
Análisis de Datos .....	;	Error! Marcador no definido.
Resultados.....	;	Error! Marcador no definido.
A) Protocolo de pulso pareado.....	;	Error! Marcador no definido.
Efecto del bloqueo de canales de Potasio.....	;	Error! Marcador no definido.
Efecto del bloqueo de los canales de Calcio .....	;	Error! Marcador no definido.
B) Modulación presináptica por receptores a opiáceos tipo $\delta$ .....	;	Error! Marcador no definido.
1) Efecto del DPDPE en presencia de TEA: .....	;	Error! Marcador no definido.
2) Efecto del DPDPE en presencia de 4-Aminopiridina: .....	;	Error! Marcador no definido.
3) Efecto del DPDPE en presencia de Bario. ....	;	Error! Marcador no definido.
4) Efecto del DPDPE en presencia de Cesio. ....	;	Error! Marcador no definido.
Discusión .....	;	Error! Marcador no definido.
Activación del receptor tipo $\delta$ por el agonista DPDPE 1 $\mu$ M. ....	;	Error! Marcador no definido.
Efecto del DPDPE en presencia de los bloqueadores de canales de potasio.....	;	Error! Marcador no definido.
Modulación presináptica por la activación del receptor $\delta$ en presencia de TEA y 4-AP. ...	;	Error! Marcador no definido.
Participación de los canales de potasio en la modulación corticoestriatal. ....	;	Error! Marcador no definido.
Canales de potasio sensibles a TEA.....	;	Error! Marcador no definido.
Canales de potasio sensibles a 4-Aminopiridina. ....	;	Error! Marcador no definido.
Canales de potasio sensibles a bario y cesio. ....	;	Error! Marcador no definido.
Activación de canales de potasio a través de receptores tipo $\delta$ .....	;	Error! Marcador no definido.
Conclusiones.....	;	Error! Marcador no definido.
Literatura Citada.....	;	Error! Marcador no definido.

## Resumen

El registro extracelular de potenciales de campo junto con el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP) fueron usados para medir la inhibición presináptica provocada por la activación de receptores a opiáceos tipo delta en la transmisión sináptica corticoestriatal. La aplicación de DPDPE (1  $\mu\text{M}$ ) agonista de receptor a opiáceos tipo delta, produjo un incremento en la FPP de un  $73.5 \pm 20.64\%$ . El bloqueo de canales de potasio mediante el empleo antagonistas no específicos produjo depresión por pulso pareado (DPP) sugiriendo un papel importante de los canales de potasio en los procesos de modulación de la liberación de neurotransmisores.

La aplicación de DPDPE en presencia de bloqueadores no específicos de canales de  $\text{K}^+$  produjo resultados diversos. Bajas concentraciones de Tetraetilamonio (TEA; 1 mM) y 4-Aminopiridina (4-AP; 1 mM) no fueron capaces de ocluir la activación de receptores tipo delta por el DPDPE. Sin embargo, la activación de receptores tipo delta por el DPDPE fue completamente ocluida en presencia de altas concentraciones de TEA (20 mM), así como en presencia de cesio (5 mM) y bario (400  $\mu\text{M}$ ). El cesio fue el bloqueador más efectivo para ocluir la acción del DPDPE, mientras que el bloqueo de canales de potasio más fuerte fue producido por la 4-AP.

Tomados en su conjunto, los datos sugieren que la inhibición presináptica de las aferentes corticoestriatales por opiáceos tipo delta es mediada por la modulación de conductancias de potasio. Nuestros datos son consistentes con la acción moduladora de la activación de receptores tipo delta a través de canales de  $\text{K}^+$  rectificadores entrantes activados por proteínas-G ( $G_{\text{IRK}}$ ), o por canales de potasio responsables de las corrientes transitorias rápidas, como es el caso del canal  $\text{K}_{\text{V}}1.4$ .

## **Introducción**

### **Transmisión sináptica y Neuromodulación.**

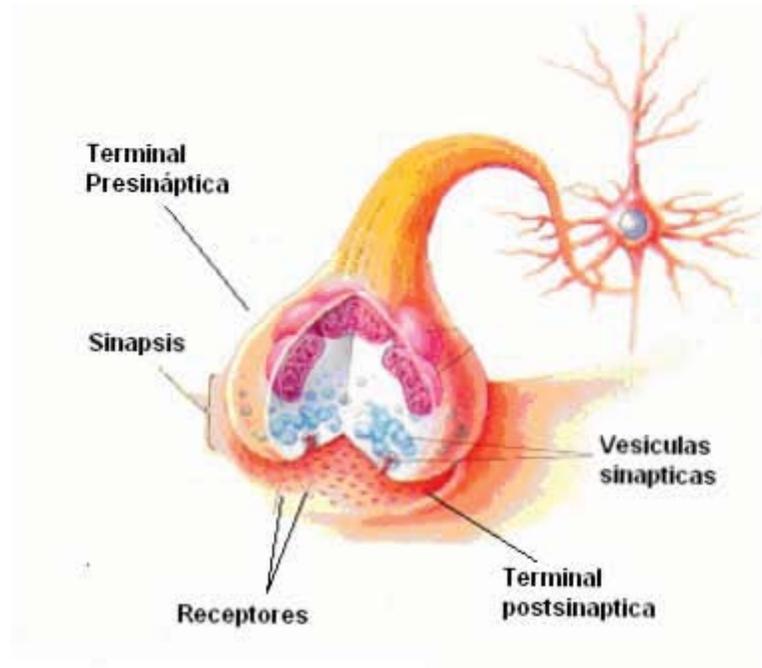
La transmisión sináptica es el proceso mediante el cual el sistema nervioso transmite su información, esta comunicación intercelular ha sido estudiada en detalle debido a su importancia en los procesos de percepción, movimientos voluntarios, aprendizaje y memoria entre otros. Dichos fenómenos se llevan a cabo en el sistema nervioso a través de las sinapsis; sitio en el cual una neurona se comunica con otra (Purves et al, 2001). Existen dos tipos de sinapsis: eléctricas y químicas. Se distinguen entre sí por su morfología y su mecanismo de funcionamiento. En las sinapsis eléctrica la célula presináptica transfiere su información a la célula postsináptica a través de una unión comunicante que forman varias conexinas entre las dos neuronas y por el cual el potencial de acción es transmitido, provocando que la neurona postsináptica se depolarice, generando de ese modo potenciales de acción postsinápticos, esta sinapsis solamente media acciones excitatorias (Lodish et al, 2002).

### **La Sinapsis Química**

En la sinapsis química la neurona presináptica esta separada de la neurona postsináptica por un espacio sináptico, la llegada de un potencial de acción a la neurona presináptica inicia el proceso de liberación de sustancias químicas conocidas como transmisores, mismos que se sintetizan, se almacenan en vesículas y se liberan por un mecanismo de exocitosis regulada por calcio desde la terminal presináptica (Walmsley et al, 1998). Los transmisores químicos liberados se difunden a través del espacio sináptico los cuales interactúan con los receptores de la membrana postsináptica, la activación de los receptores causa que la célula se despolarice o se hiperpolarice es decir; producen acciones excitatorias ó inhibitorias en las células postsinápticas dependiendo del tipo de transmisor que sea liberado (Hammond, 2001; Lodish et al, 2002).

Es importante mencionar que la liberación del transmisor no solamente va depender de la llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica sino también de la entrada del ión calcio a través de la apertura de los canales de calcio sensibles al voltaje figura 1.

---



**Figura 1. La sinapsis.** Esquema que muestra la disposición de los elementos presinápticos y postsinápticos en una sinapsis química típica.

---

Las sinapsis químicas se han clasificado como rápidas y lentas. Se considera que una sinapsis química es rápida cuando se activan receptor ionotrópicos, los cuales están ligados directamente a canales en la membrana produciendo un flujo inmediato de corriente a través de los canales iónicos dependientes de voltaje. Mientras que la sinapsis química lenta ocurre cuando el neurotransmisor (frecuentemente neuropéptidos) activan receptores metabotrópicos los cuales están ligados a proteínas-G y a mecanismos de segundos mensajeros (Kandel y Schwartz, 1982; Gage, 1992; Dunlap 1998; Hille, 2001;). La proteína-G funciona amplificando una señal recibida por un receptor transmembranal, transmitiendo el mensaje a una proteína efectora dentro de una neurona.

Las proteínas-G pueden interactuar con dos clases principales de proteínas efectoras, canales iónicos y enzimas, lo cual puede provocar que un canal se active o inactive, así como estimular ó inhibir a las enzimas (Wickman y Clapham, 1995; Hille, 2001; Rockhold 2002).

## **Neurotransmisores**

Los neurotransmisores son sustancias que se liberan en la sinapsis química desde las terminales presinápticas y que afectan a la célula postsináptica (Zimmerman, 1993; Kandel, 2000; Hammond, 2001). Se conoce que en algunas sinapsis muchos transmisores activan no solamente receptores en las células postsinápticas (heteroreceptores), sino que se pueden activan a si mismas (autoreceptores). La activación de los autoreceptores usualmente modulan la transmisión sináptica limitando la liberación del transmisor (Miller, 1998). Debido a lo anterior se puede decir que un neurotransmisor va ser excitatorio o inhibitorio de la transmisión sináptica dependiendo del tipo de receptores que éste active (Hammond, 2001; Hille, 2001).

Se considera un neurotransmisor a una sustancia cuando es capaz de producir cambios en el potencial de membrana de la célula postsináptica, ya sea despolarizando (estimulando) ó hiperpolarizando (inhibición) a la célula. Estos cambios se dan de manera rápida cuando el transmisor usa canales iónicos dependientes de voltaje, y lentos cuando participan los mecanismos de segundos mensajeros. Asimismo, otras características para definir a una sustancia neurotransmisora pueden ser: A) El transmisor debe de estar localizado principalmente en terminales nerviosas, preferentemente en las vesículas sinápticas agregadas dentro de las terminales. B) El transmisor es selectivamente liberado por estimulación nerviosa, la liberación depende también del flujo del calcio al interior de la célula. C) El transmisor reacciona específicamente con receptores de la membrana postsináptica y presináptica, o en ambos. Estas respuestas son bloqueadas por antagonistas específicos y activadas por agonistas específicos los cuales simulan la acción del transmisor.

D) La aplicación de transmisores purificados a la célula postsináptica evoca la misma respuesta como la liberación del transmisor por un estímulo nervioso. E) Se presenta un mecanismo de inactivación para permitir que la membrana postsináptica regrese a su potencial de reposo (Strand, 1999).

Los neurotransmisores y neuromoduladores clásicos incluyen la acetilcolina, dopamina, serotonina, aminoácidos excitatorios como el glutamato y el ácido aspartico y los inhibitorios GABA y glicina. Otros neuromoduladores de naturaleza no peptídica que se incluyen en este grupo son la histamina y óxido nítrico, sin embargo no presentan las propiedades necesarias para considerarlas como neurotransmisores (Strand, 1999).

## **Neuromoduladores**

Es posible de que algunas sustancias que actúan como neurotransmisores en algunos tipos de sinápsis, puedan actuar como neuromoduladores en otras sinapsis (Masaya y Takatsuji, 1998). Estas sustancias son principalmente los neuropéptidos; los cuales participan de manera importante en el control y expresión del comportamiento en un gran número de animales. Entre los neuropéptidos se encuentran la somatostatina, la sustancia P, los péptidos opioides como las  $\beta$ -endorfinas, las dinorfinas y las encefalinas (Metionina encefalina y Leucina encefalina) (Hille, 2001, Hammond, 2001). Las tres clases de receptores a opiáceos  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , parecen actuar como neuromoduladores, inhibiendo la liberación de muchos neurotransmisores incluyendo a la epinefrina, dopamina, acetilcolina y sustancia P (Strand, 1999).

Dentro del sistema nervioso central los neuropéptidos son generalmente considerados como moduladores de la transmisión sináptica. Sin embargo algunos péptidos pueden actuar también como neurotransmisores (Björklund et al, 1990; Koob et al, 1990).

Típicamente los neuropéptidos se coliberan con uno o mas neurotransmisores (Hökfelt, 1991; Lundberg, 1996), por ejemplo los péptidos coexisten con los transmisores clásicos tales como el glutamato, GABA, glicina y ATP encontrándose juntos en una misma neurona (Hökfelt et al, 2000). Se ha demostrado que muchos péptidos en las neuronas utilizan el GABA como su principal transmisor (Penny et al, 1986).

En términos generales se puede decir que los neuromoduladores: A) Alteran el efecto de los transmisores clásicos en las sinápsis. B) Coexisten con los transmisores clásicos en las terminales nerviosas. C) Actúan más lentamente y su efecto se prolonga ya que utilizan proteínas-G ligadas a receptores y subsecuentemente a segundos mensajeros. D) No se restringen espacialmente al espacio sináptico ni están restringidos a la duración del potencial de acción, E) Su liberación depende del potencial de acción pero pueden ser secretados en procesos continuos o intermitentes. F) La liberación del neuromodulador depende frecuentemente de la duración, frecuencia y patrones de estimulación. G) Ellos son efectivos a bajas concentraciones (picomolar a nanomolar), ya que poseen alta potencia. H) Los neuropéptidos moduladores pueden contener pequeños transmisores dentro de su estructura tales como ácido glutámico, GABA o aspartato. Se desconoce si estas pequeñas moléculas se coliberan junto con los opiáceos y funcionan como neurotransmisores. I) Sus mecanismos de inactivación puede darse a través de enzimas proteasas y péptidos (Strand, 1999).

## **Modo de Acción de los Neuromoduladores**

El mecanismo por el cual los neuromoduladores afectan la excitabilidad y los patrones de disparo difieren notablemente. Muchos neuromoduladores neuropéptidos actúan a través de segundos mensajeros, utilizando proteínas-G (Wickman y Clapham, 1995). Cambios en los niveles de AMPc, calcio, inositol trifosfato, o diacilglicerol pudieran afectar la permeabilidad de la membrana a iones y consecuentemente la excitabilidad de la membrana postsináptica, así como la respuesta de la célula a los neurotransmisores.

Los neuromoduladores pueden afectar un gran número de receptores; los cuales pueden ser postsinápticos, presinápticos, o autoreceptores, dependiendo de su localización. Ellos pueden actuar presinápticamente incrementando (facilitando) o inhibiendo (deprimiendo) la liberación de otros transmisores; o pueden actuar sobre autoreceptores presinápticos para facilitar o inhibir su propia liberación (Miller, 1998).

## **Modulación Sináptica**

Se conoce que la activación de receptores metabotrópicos en las terminales presinápticas modulan la función de los canales de calcio y potasio dependientes del voltaje, así como la producción de segundos mensajeros y fosforilación de proteínas (Levitan, 1994). La modulación de estos canales puede regular la liberación del neurotransmisor controlando la cantidad de calcio que entra a la terminal presináptica durante un potencial de acción (Eliot et al, 1993; Wu y Saggau, 1997). Tales alteraciones de las propiedades de los canales son frecuentemente llamadas modulación, este proceso permite que la célula este controlada por señales internas y externas. Los estímulos que inducen modulación son los neurotransmisores; estas moléculas usualmente actúan sobre un receptor que manda señales a la membrana para iniciar una amplia cascada de eventos intracelulares afectando a los canales, bombas, enzimas, al citoesqueleto, factor de transcripción y otras proteínas. En las neuronas la acción moduladora puede disminuir la liberación del neurotransmisor. Se puede hablar de modulación a nivel presináptico y postsináptico. La modulación postsináptica se refleja como una reducción de la respuesta por los receptores específicos afectando directamente la excitabilidad postsináptica. Sin embargo la modulación presináptica puede producir una disminución en la liberación del transmisor sináptico, y puede servir como un mecanismo de ajustar la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación de neurotransmisores (López y Brown, 1992; Miller, 1998).

En el caso de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas-G, se han sugerido tres mecanismos principales de modulación presináptica: A) La inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  en la

terminal nerviosa, B) la activación de canales de  $K^+$  presinápticos y C) modulación directa de uno ó más componentes del aparato de liberación vesicular (Wickman y Clapham, 1995; Wu y Saggau, 1997; Miller, 1998; Hille, 2001).

## **Modulación Sináptica por canales de Calcio**

La modulación a través de los canales de calcio tiene un impacto amplio sobre la fisiología de la neurona, ya que la entrada de calcio además de contribuir a la liberación de neurotransmisores evoca diversas respuestas celulares tales como la apertura de canales de potasio dependientes de calcio, propagación del impulso nervioso, reacciones enzimáticas y transcripción de genes (López y Brown, 1992).

La liberación del transmisor es altamente sensible a la entrada de calcio en la terminal presináptica, un mecanismo por el cual la entrada de calcio puede ser modulada es por el cambio en la amplitud y duración de un potencial de acción (PA) en la terminal presináptica. Si el PA es prolongado por la aplicación de bloqueadores de canales de potasio dependientes de voltaje, entonces los canales de calcio permanecerán abiertos por un largo periodo de tiempo dando como resultado un aumento en la entrada de calcio que incrementa la liberación del transmisor (Augustine, 1990).

En términos generales los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) han sido clasificados de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en cinco grupos T, L, N, P/Q y R (Birnbaumer et al, 1994, Catterall, 1999; Hille, 2001). Algunos de estos canales, particularmente aquellos involucrados en la liberación de neurotransmisores son susceptibles de ser modulados por reacciones de fosforilación y defosforilación llevados a cabo por diferentes proteínas-G (Wu y Saggau, 1997).

## **Modulación Sináptica por canales de Potasio**

Previos trabajos muestran que bloqueadores de canales de potasio incrementan la liberación del transmisor alargando presinápticamente potenciales de acción indicando que los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje ( $K_V$ ) en la terminal nerviosa participan en la regulación de la liberación del transmisor (Katz y Miledi, 1969; Augustine, 1990). Por ejemplo los canales de  $K_V$  en la terminal nerviosa también pueden mediar modulación sináptica a través de señales moleculares y drogas (Ishikawa et al, 2003). La modulación presináptica por canales de potasio consiste en activar conductancias de potasio, a través de receptores acoplados a proteínas-G (Mitz et al, 1995). Al incrementar la conductancia del ión  $K^+$  se disminuye la duración y amplitud del potencial de acción en la terminal sináptica. Por lo tanto la depolarización en la terminal es menos efectiva, ya que los canales de  $Ca^{2+}$  permanecen menos tiempo abiertos y en consecuencia una menor cantidad de neurotransmisor es liberado (Graham y Redman, 1994). Robitaille y colaboradores (1993) observaron que en la terminal motora de anfibio los canales de potasio tipo  $BK_{Ca}$  son activados durante la entrada de calcio lo que los llevo a pensar que estos canales se encuentran cerca de los canales de calcio pudiendo regular la liberación del transmisor.

A continuación se describen los diferentes canales de potasio que se pueden encontrar en las terminales nerviosas.

### **Canales de Potasio en la Terminal Presináptica**

Los canales de potasio son muy diversos y se presentan en las células excitables y no excitables. Los miembros de esta familia de canales participan en los procesos de señalización celular regulando la liberación de neurotransmisores, latido del corazón, secreción de insulina, excitabilidad neuronal, contracción del músculo liso y volumen celular entre otros (Shieh et al, 2000).

Los canales de potasio que se encuentran en las terminales nerviosas pertenecen a una familia muy diversa, en general todos participan en el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana, algunos se activan después de la llegada de un potencial de acción a la terminal, disminuyendo la duración del potencial de acción, así como la entrada de calcio y modulan el disparo de las neuronas (Meir et al, 1999). Como resultado de estas acciones los canales de potasio juegan un papel crítico en la regulación de la liberación del transmisor (Gribkoff et al, 2001; Dodson y Forsythe, 2004). Debido a que los canales de potasio juegan un papel importante en la excitabilidad y en los patrones de disparo de las células, no es sorprendente que su probabilidad de apertura este frecuentemente regulada por otras señales celulares. Fisiológicamente se muestra un control intracelular por segundos mensajeros y proteínas kinasas (Hille, 2001).

Los canales de potasio se caracterizan tanto funcionalmente y/o molecularmente dentro de tres clases: 1) La familia de rectificadores salientes dependientes de voltaje (Kv), 2) la familia de canales rectificadores entrantes; 3) y la familia de canales activados por calcio. La rectificación se refiere a la relación no lineal entre la corriente y voltaje de un canal iónico. Los canales de potasio dependientes de voltaje se componen de subunidades  $\alpha$  integradas en la membrana las cuales forman el poro del canal y algunas veces se encuentran asociadas con subunidades  $\beta$ . Las subunidades  $\beta$  cuando se presentan pueden modificar las propiedades de compuerta del canal (McManus et al, 1995). Cada subunidad  $\alpha$  contiene seis segmentos hidrofóbicos (repelen el agua), S1-S6, que se encuentran en la membrana con un dominio formador del poro llamado H5 ó P, entre el S5 y el S6 se encuentra el segmento S4, el cual es considerado como el censor del canal cargado positivamente (Fig. 2). Los canales de Kv son intrínsecamente sensibles a cambios en el potencial de membrana y son típicamente activados a potenciales de membrana por arriba del potencial de reposo o sea se abren en respuesta a la depolarización de la membrana y sirven para repolarizar la célula (Jan y Jan, 1994).

Los canales de potasio rectificadores entrantes por el contraste tienen solamente 2 dominios transmembranales en cada subunidad y son sensibles a cambios en la concentración de potasio (Fig. 2). Estos canales permiten que el flujo de iones potasio sea mayormente hacia el interior de la membrana que hacia el exterior, controlando el potencial de reposo de la membrana oponiéndose a la depolarización sin causar una masiva pérdida de iones potasio (Yeh y Nung, 1994). Finalmente los canales de potasio activados por calcio alteran la trayectoria de la espiga de las células excitables y generalmente disminuyen la excitabilidad inducida por el incremento de calcio.

Cada clase exhibe regulación por proteínas-G dependiendo de la vía de segundos mensajeros, las evidencias provienen principalmente de estudios sobre los canales rectificadores entrantes (Wickman y Clapham, 1995).



**Figura 2.** Esquema representativo de la clasificación estructural de canales de potasio. En A se muestran los canales de potasio dependientes de voltaje se componen de 4 subunidades  $\alpha$ , cada subunidad contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un poro conductivo entre el segmento S5 y S6 con un censor del voltaje (cargado positivamente) localizado en el segmento 4. En B canales de potasio rectificadores entrantes con 4 subunidades que contienen dos segmentos transmembranales (M1 y M2) con un poro (P). En C, canales de potasio con 4 segmentos transmembranales y dos poros (Shieh et al, 2000).

## **1) Canales de potasio dependientes de voltaje:**

**A) Los rectificadores retardados  $I_K$ .** Estos canales son sensibles a cambios en el voltaje de la membrana, a la llegada de un potencial de acción estos canales se activan con un retardo produciendo principalmente la repolarización de la membrana. Por lo que un potencial puede ser corto (1-100 ms) ó largo (100-1000 ms). Se dividen en dos componentes el lento y el rápido; el primero es el responsable de la repolarización de la membrana y regula la duración de los potenciales de acción, el segundo esta involucrado en la regulación de la liberación del transmisor (Meir et al, 1999).

**B) Canales de potasio Tipo A.** Estos canales son importantes en la regulación de la excitabilidad celular en neuronas de vertebrados e invertebrados (Hille, 2001). Dichos canales se activan en la depolarización especialmente después de un periodo de hiperpolarización, regulan el disparo repetitivo de las neuronas, en algunos casos contribuyen a la repolarización del potencial de acción. Se activan e inactivan rápidamente. Son importantes en la frecuencia de modulación de fenómenos tales como facilitación, potenciación tetánica y potenciación posttetánica. En el potencial de reposo usualmente están inactivados y en general sirven como reguladores del intervalo interespiga.

**2) Los rectificadores entrantes ó anómalos (Jan y Jan, 1997).** Estos canales se activan por un aumento en la hiperpolarización y disminuye en la depolarización. Son blanco importante de modulación por neurotransmisores y segundos mensajeros. Los canales de potasio rectificadores que son regulados por proteínas-G ( $G_{irK}$ ) se activan por algunos transmisores como los opiáceos, acetilcolina, dopamina, glutamato y serotonina. La superfamilia de los  $K_{ir}$ , en la cual se incluye proteínas-G ligados a rectificadores entrantes y a canales de potasio dependientes del ATP. Los canales de potasio rectificadores entrantes están presentes en el músculo esquelético, células del corazón y neuronas centrales donde ellos son importantes mediadores de la acción del transmisor (Hille, 2001).

Se han encontrado canales Kir en las terminales nerviosas tálamo-corticales e hipocampo sugiriéndose que median la acción de receptores a opiáceos tipo  $\mu$  presentes en las terminales nerviosas (Ponce et al, 1996).

**3) Las corrientes de potasio dependientes de calcio ( $I_{K(Ca)}$ ):** Se encuentran en las terminales sinápticas (Knaus et al, 1996), son frecuentemente el blanco de modulación por neurotransmisores y están implicados en la patogénesis neurológica y desordenes psiquiátricos (Faber y Sah, 2003). En muchas neuronas, el flujo de calcio durante potenciales de acción activa canales de potasio que generan corrientes que contribuyen a la repolarización de potenciales de acción y al postpotencial hiperpolarizante. (Sah y McLachlan, 1992) Los canales de potasio dependientes de calcio hacen más larga la hiperpolarización, esta corriente se activa por un incremento en la concentración de calcio. Aún en concentraciones internas de calcio estables, los canales  $BK_{Ca}$  se comportan probablemente como los rectificadores retardados, activándose en la depolarización, por lo que, a mayor depolarización se incrementan las conductancias de ( $I_{K(Ca)}$ ) (McManus, 1991).

En base a sus propiedades biofísicas y farmacológicas los  $K_{(Ca)}$  se dividen en corrientes lentas y corrientes rápidas. La corriente rápida se activa en milisegundos y participa en la fase repolarizante de un potencial de acción. La corriente lenta se activa con un retardo de 10 milisegundos y participa principalmente en el postpotencial hiperpolarizante (Sivaramakrishnan et al, 1991a; Meir et al, 1993).

Los canales de potasio dependientes de calcio se pueden dividir en dos grupos en base a su conductancia: los canales  $BK_{Ca}$  (mslo) y los canales  $SK_{Ca}$  (ski).

La activación de los canales  $BK_{Ca}$  contribuye a la repolarización del potencial de acción, son sensibles al voltaje, y requieren 1-10  $\mu M$  de calcio para activarse a potenciales de membrana cercanos al potencial de membrana de reposo (-50 a -70 mV).

Los canales de potasio  $SK_{Ca}$  juegan un importante papel en la excitabilidad de la célula, son selectivos de iones potasio, independientes del voltaje y se activan por un incremento en la concentración intracelular de calcio durante un potencial de acción.

La concentración de calcio requerida para su activación oscila desde los 10 nM a los 10  $\mu$ M, así como también se requiere depolarización de la membrana (Bielefeldt y Jackson, 1993; Gribkoff et al, 2001).

En muchas neuronas, los potenciales de acción son seguidos de una hiperpolarización, la cual puede durar varios segundos. Esta hiperpolarización tiene varias fases como resultado de la activación de diferentes tipos de canales de potasio; la hiperpolarización rápida la cual dura 1-10 ms se debe principalmente a la activación de corrientes de potasio dependientes de voltaje. La hiperpolarización rápida puede ser prolongada con una duración de varios cientos de milisegundos a segundos, producida por la activación de conductancias de potasio dependientes de calcio que son secundarias a la entrada de calcio durante un potencial de acción y usualmente se le conoce como pospotencial hiperpolarizante. El pospotencial hiperpolarizante tiene dos funciones: limita la frecuencia de disparo de la neurona y es responsable de generar el fenómeno de adaptación a la frecuencia de disparo (Sah, 1996).

El pospotencial hiperpolarizante (PPH) presenta dos componentes que son mediados por diferentes canales de  $K_{(Ca)}$ : El componente rápido  $PPH_R$  el cual ayudan a repolarizar el PA y regulan el intervalo interespiga, mientras que el componente lento  $PPH_L$  ayuda en la adaptación a la frecuencia de disparo.

### **Farmacología de los canales de potasio**

Los canales de potasio pueden ser modificados por varias toxinas, neurotransmisores, drogas y iones. Y se dividen en dos categorías: agentes que inhiben o bloquean los canales de potasio y agentes que incrementan su actividad. En la tabla I se muestra algunos de los bloqueadores de los canales de potasio.

Tabla I. Agentes bloqueadores de los canales de potasio.

Canales de potasio	Bloqueadores que actúan externa- e internamente.
Rectificadores retardados.	TEA, Cs <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , 4-AP, Dendrotoxina etc.
Tipo A	4-AP, TEA, Dendrotoxina etc.
K <sub>(ca)</sub>	TEA (BK), Cs <sup>+</sup> , Apamina (SK), Caribdotoxina etc.
Rectificadores entrantes	TEA, Cs <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Rb <sup>+</sup> etc.
Rectificadores retardados:	TEA, Ba <sup>2+</sup> , Cs <sup>+</sup> (Castle et al, 1989).
Componente rápido	4-AP (Sivaramakrisnan et al, 1991b)
Componente lento.	El componente lento se bloquea con DTX (Dreyer y Penner, 1987; Tabti et al, 1989).
Corriente A, son canales dependientes de voltaje.	TEA 20 mM bloquea parcialmente (Golard et al, 1992). TEA 1-2 mM (Thorn et al, 1991) Sensible a 4-AP (3-5 mM; Golard et al, 1992). Cs <sup>+</sup> (Bielefeldt et al, 1992) Sensible a 4-AP (1-4 mM), insensible a TEA (1-20 mM), Sensible al TEA y Cs <sup>+</sup> intracelular (Rudy, 1988).
Rectificadores entrantes ó anómalos; Katz 1949).	Sensible al TEA intracelular, Cs <sup>+</sup> y Ba <sup>2+</sup> (Rudy, 1988). Cs <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Rb <sup>+</sup> , Sr <sup>2+</sup> (2 mM). Menos sensible a TEA extracelular y Cs <sup>+</sup> intracelular (Nicoll et al, 1990).
Los canales de potasio dependientes de calcio (K <sub>ca</sub> ). Se dividen en dos corrientes: BK <sub>ca</sub> y SK <sub>ca</sub> .	Generalmente se bloquean con el Ba <sup>2+</sup> y Cs <sup>+</sup> . SK insensibles a TEA, pero son sensibles a apamina (Rudy, 1988). BK son altamente sensible a TEA externo, pero a bajas concentraciones y por caribdotoxina (Rudy, 1988; Yellen, 1984). BK sensibles a TEA (20 mM)

Abreviaturas: TEA; tetraetilamonio, DTX; dendrotoxin, 4-AP; 4 aminopiridina, Ba<sup>2+</sup>; bario, Cs<sup>+</sup>; cesio.

### Características de los bloqueadores de los canales de potasio.

Casi todos los canales de potasio son bloqueados por TEA, Ba<sup>2+</sup>, y Cs<sup>+</sup> intracelular. Sivaramakrisnan y colaboradores (1991) mostraron que 4-AP bloquea canales de potasio rectificadores retardados en las terminales axónicas de calamar haciendo que el potencial de acción se prolongue

incrementando la liberación del transmisor. Los rectificadores retardados pueden ser bloqueados por la aplicación extracelular de 4-AP.

El TEA es impermeable y su efecto bloqueador difiere cuando se aplica internamente ó externamente sugiriendo dos sitios de unión (Amstrong y Hille, 1972) su aplicación externa bloquea algunas pero no todas las corrientes de potasio (Stanfield, 1983), su aplicación interna es menos especifica y usualmente menos potente. El TEA es un bloqueador específico de BK<sub>ca</sub> y SK<sub>ca</sub> cuando se aplica extracelular e intracelular pero los canales BK<sub>ca</sub> parecen ser mas sensibles a la aplicación interna de TEA que los canales SK<sub>ca</sub> (Meir et al, 1999). La alta sensibilidad al bloqueador TEA de los BK<sub>ca</sub> consiste con la presencia de un residuo aromático en la boca del poro (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y MacKinnon, 1992). Los SK<sub>ca</sub> son sensibles a apamina (Lancaster et al, 1991).

Los canales de potasio activados por calcio pueden también ser modulados por péptidos incrementando su apertura (Ewald et al, 1985).

El ión Cesio (Cs<sup>+</sup>) es otro bloqueador no específico de muchos canales de potasio (Hille, 2001), bloquea las corrientes tipo A (Bielefeldt et al, 1992), aunque también pueden ser bloqueadas con 4-AP y TEA (Thorn et al, 1991). Cationes divalentes en particular Bario (Ba<sup>2+</sup>) también bloquean los canales de potasio (Amstrong y Taylor, 1980; Latorre y Miller, 1983). Bloquea presináptica mente a los canales de potasio dependientes de calcio cuando se aplica extracelular o intracelularmente (Meir et al, 1999).

Los canales de K<sub>(Ca)</sub> han sido detectados en las terminales presinápticas de varias sinápsis pero desgraciadamente su papel en la regulación de la transmisión sináptica se desconoce (Robitaille y Charlton, 1992).

Entre las canelopatias producidas por canales de potasio tenemos a la neuromiotonia adquirida (Síndrome de Isaac). Es un desorden caracterizado por hiperexcitabilidad de los nervios motores y algunas veces por anormalidades centrales.

La hiperexcitabilidad nerviosa del síndrome de Isaac es probablemente el resultado de un ataque inmunológico sobre los canales de potasio dependientes de voltaje localizados a lo largo del nervio motor o en la terminal nerviosa (Meir et al, 1999).

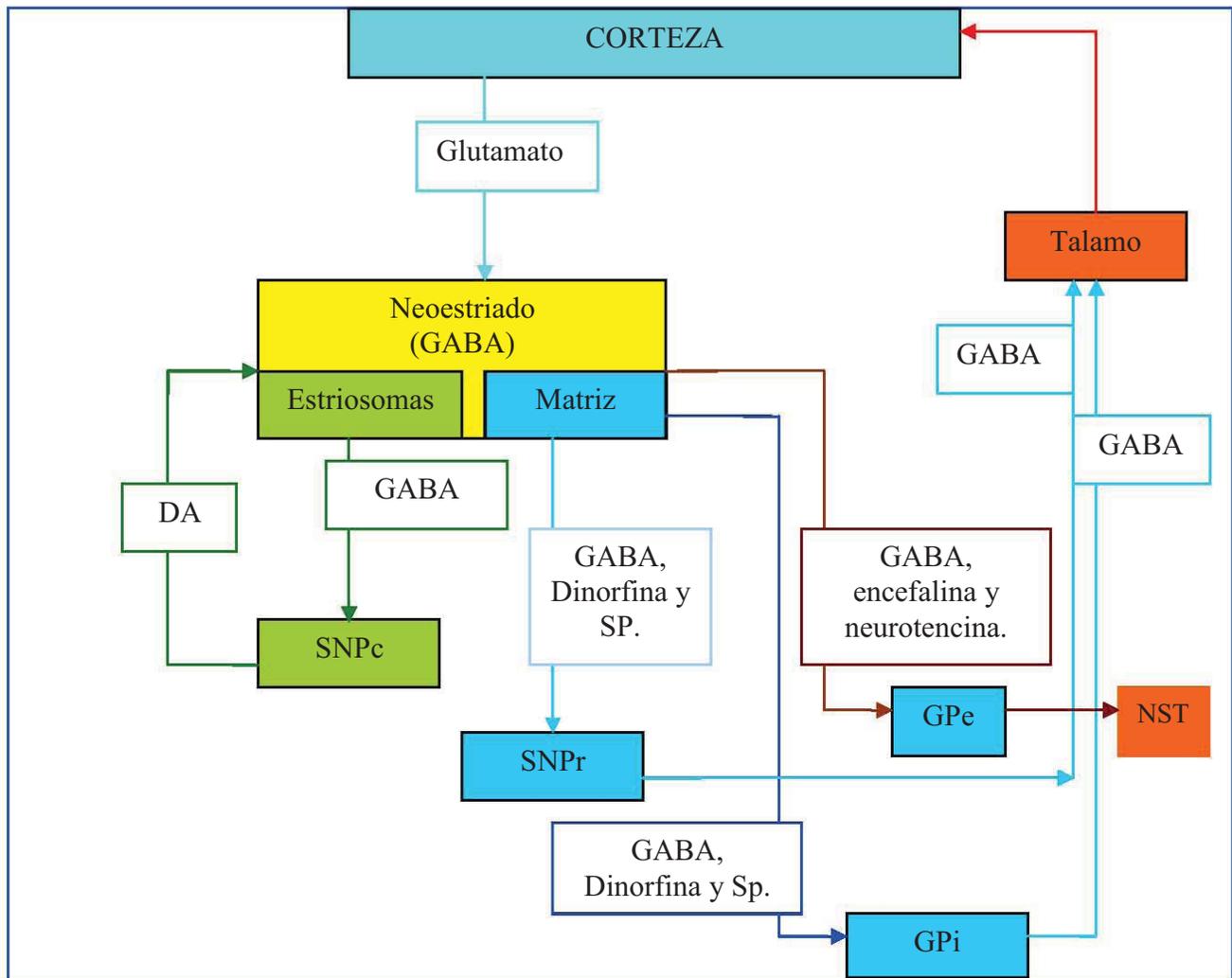
### **Modulación sináptica en el neostriado de rata**

El neostriado esta formado por el núcleo caudado y putamen, es la principal estructura de entrada de los ganglios basales, recibe aferentes glutamatérgicas de todas las áreas de la corteza cerebral de las áreas motoras, sensoriales, de asociación y límbicas (McGeorge y Faull, 1989; Bennet y Bolam, 1994; Bargas et al, 1998b; Venance y Glowinski, 2003). Estas aferencias establecen sinapsis glutamatérgicas con las neuronas espinosas medianas del neostriado (Calabresi et al, 1993; Bargas et al, 1998a), también recibe aferentes del tálamo, y es densamente innervado por neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y por neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe, el neostriado proyecta a la sustancia nigra pars reticulata y al globo pálido interno; estructuras de salida de los ganglios basales (Fig. 3) (Smith y Bolam, 1990; Zheng y Wilson, 2002). Funcionalmente el neostriado parece actuar como un detector de los patrones de distribución de las entradas corticales (Wickens, 1993; Graybiel et al, 1994; Wilson, 1995).

El neostriado presenta neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección son de talla mediana (10-20  $\mu\text{m}$ ), con dendritas que están densamente cubiertas de espinas (NEM) y su principal neurotransmisor es el GABA.

En la rata estas células representan el 96% de la población celular del estriado (Kemp y Powell, 1971; Jiang y North, 1991) para disparar necesitan recibir al mismo tiempo fuertes entradas sinápticas controladas por las neuronas corticales glutamatérgicas (Bargas et al, 1998a).

Muchas pero no todas las NEM's muestran baja actividad espontánea y son caracterizadas por potenciales de membrana hiperpolarizados.



**Figura 3.** Esquema que muestra el circuito corticoestriatal. Abreviaturas de estructuras: SNPc, Sustancia negra *pars compacta*; SNPr, Sustancia negra *pars reticulata*; GPe, globo pálido externo; GPi, Globo palido interno; NST, núcleo subtalámico. Abreviaturas de Neurotransmisores: DA, dopamina; GABA, Ácido Gama Aminobutirico; SP, sustancia P Lovinger y Tyler 1996.

Fuertes conductancias de potasio mantienen potenciales de membrana de reposo durante entradas corticales débiles (Nisenbaum y Wilson, 1995). Las NEM's representan un paso clave en los procesos superiores en la integración de señal corticoestriatal, y posiblemente en el control motor y formación de hábitos (Venance y Glowinski, 2003).

Diferentes subpoblaciones de las neuronas espinosas medianas (NEM's) se distinguen por su morfología, distribución, sitios de proyección y marcadores bioquímicos (Gerfen, 1992). De este modo el estriado esta dividido en dos compartimientos anatómico-funcionales; los estriosomas y la matriz los cuales difieren en sus aferentes y eferentes (Graybiel et al, 1981).

Las NEM's en el compartimiento de los estriosomas proyectan a la sustancia nigra *pars compacta* y contiene SP, dinorfina y encefalinas, expresan receptores  $\mu$  mientras que las NEM's de la matriz no lo expresan (Graybiel, 1990; Gerfen, 1992). Las NEM's de la matriz son divididas en dos clases de células las que pertenecen a la vía indirecta y las de la vía directa. Las NEM's de la vía directa proyecta a la sustancia nigra *pars reticulata* y al segmento interno de los globos pálidos y muestran una alta expresión de receptores dopaminérgicos D1, son ricos en SP y dinorfina. Las NEM's de las vías indirectas proyectan al segmento externo de los globos pálidos, muestran alta expresión de receptores dopaminérgicos D2 y contienen neurokinina B y encefalinas (Gerfen, 1992; Nicola et al, 2000).

### **Papel funcional del neostriado**

La información que es procesada en el neostriado esta involucrada en la regulación de las funciones motoras, en particular, la planificación, iniciación y ejecución del movimiento (Bargas et al, 1998a; Graybiel, 1990).

Lesiones en el estriado o en sus aferentes puede causar problemas neurológicos como la enfermedad del Parkinson (caracterizada por temblor, rigidez y lentitud de movimiento) o la de Huntington que se manifiesta por movimientos involuntarios progresivos de tipo danzístico y demencia (Dowling, 1992; Gederman, 2003).

Estas patologías han sido relacionadas principalmente con aspectos funcionales de la dopamina estriatal, sin embargo se ha sugerido que los neuropéptidos también pudieran estar participando en la regulación de diversas funciones motoras (Gerfen y Wilson 1996; Graybiel, 1990).

El cuerpo estriado también adquiere importancia en la formación de hábitos de comportamiento, siendo el principal blanco del abuso de drogas, que ejercen una fuerte influencia sobre la plasticidad sináptica a largo plazo (Schultz, 1998). El estriado dorsal puede contribuir a la formación de hábitos conductuales asociados al abuso de drogas, que inician con el uso de forma casual y progresan hacia la adicción y uso compulsivo de drogas (Hoffman y Lupica, 2001; Gederman et al, 2003).

Debido a la importancia en los procesos de modulación sináptica, se han realizado trabajos para investigar el proceso de modulación en la sinapsis corticoestriatal de rata, ya que aun se desconoce diversos aspectos sobre su modulación (Lovinger y Tyler, 1996; Hernández-Echeagaray et al, 1996; 1998b; Barral et al, 1999, 2000, 2003). En la sinapsis corticoestriatal es posible encontrar modulación por diversos neurotransmisores tales como adenosina, dopamina, acetilcolina, GABA, opiáceos y serotonina que son liberados en el neostriado (Wilson, 1998).

Entre los neurotransmisores que están involucrados en la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas se encuentran al GABA, a través de la activación del receptor GABA<sub>B</sub> (Barral et al, 2000), la dopamina mediante el receptor D<sub>2</sub>, la acetilcolina mediante los receptores muscarínicos (Hernández-Echeagaray et al, 1998; Barral et al, 1999) y el glutamato por medio de los receptores metabotrópicos mGluR<sub>1</sub>-mGluR<sub>8</sub> (Miller, 1998).

Uno de los objetivos de las investigaciones que se han realizado por diversos laboratorios ha sido principalmente el estudio de los neurotransmisores y canales iónicos que pudieran estar participando en la modulación de la sinápsis corticoestriatal (Wu y Saggau, 1997; Bargas et al, 1998b, Miller, 1998; Barral et al, 1999; 2000; 2003).

Las primeras investigaciones se enfocaron en estudiar a los canales de calcio que participan en la liberación de neurotransmisores así como a la contribución de ellos en la modulación presináptica. Trabajos previos han mostrado que en el neostriado y en la corteza las neuronas presentan canales de calcio de tipo L, N, P/Q y R (Bargas et al, 1994; Melmerstein et al, 1999; Foehring et al, 2000).

Sin embargo los canales de calcio reportados en las terminales glutamatérgicas de la sinapsis corticoestriatal son únicamente los canales N, P/Q y L (Bargas et al, 1998b; Barral et al, 2001). Otras investigaciones mostraron que los únicos canales de calcio que participan en la liberación son los canales tipo N, P/Q, la participación de los canales de tipo L es mínima, o no participan (Bargas et al, 1998b); mientras que los canales tipo T no se encuentran presentes (Lovinger et al, 1994). Posteriores investigaciones sugirieron que los principales canales de calcio que participan en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis corticoestriatal son los canales N y P/Q mientras que los canales tipo L aunque están presentes en las terminales glutamatérgicas posiblemente no se encuentran en la zona activa de la sinapsis, por lo que no participan en la liberación de neurotransmisor, sin embargo son susceptibles de ser modulados (Barral et al, 2001).

Una vez establecido el papel que cada uno de los canales de calcio tiene en las terminales glutamatérgicas, se ha sugerido que los agonistas de los diferentes neurotransmisores y neuromoduladores propios del neostriado pueden producir inhibición presináptica, y que ésta modulación se lleva a cabo a través de los canales de calcio tipo P/Q (Barral et al, 1999, 2000, 2001). Se había reportado previamente que los neurotransmisores acetilcolina y GABA tienen efectos presinápticos (Williams y Johnston, 1993; Dutar y Nicoll, 1993).

Los resultados de estas investigaciones sugieren que la activación de receptores metabotrópicos tanto colinérgicos como GABAérgicos producen un incremento muy importante en la facilitación por pulso pareado (disminución en la probabilidad de liberación del neurotransmisor) y que esta modulación ocurre principalmente a través de canales de calcio tipo P/Q (Barral et al, 1999; 2000).

Sin embargo no se excluye la posibilidad de que existan otros mecanismos de modulación presináptica en la sinapsis corticoestriatal, como es el caso de la activación de conductancias de potasio junto con la participación de otros neurotransmisores que se encuentran en el neostriado. Debido a lo anterior otros estudios (Barral et al., 2003) se enfocaron en determinar si otros neuromoduladores tales como los opiáceos, que se encuentran en altas concentraciones en el neostriado, podían también

producir inhibición presináptica a través de los canales de calcio tipo N y P/Q; la activación de receptores a opiáceos como el  $\mu$  producen modulación en la liberación del neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales, sin embargo esta inhibición presináptica no se produce a través de la modulación de los canales de calcio, por lo que se ha sugerido que la modulación de la liberación de glutamato por opiáceos  $\mu$  en las terminales glutamatérgicas puede estar dada por la activación de conductancias de  $K^+$  u otros mecanismos (Barral et al, 2003).

## **Péptidos Opioides**

El descubrimiento de los opiáceos endógenos, denominados endorfinas por Simon y Hiller (1978), y el mas ampliamente distribuido las encefalinas, fue un proceso diferente en comparación con muchas otras moléculas biológicas, los receptores se identificaron antes de sus ligandos. El interés por el estudio de los opiáceos endógenos aumento cuando se comprobó la existencia de actividad por opiáceos en el cerebro y glándula pituitaria (Hughes et al, 1975). Los opiáceos endógenos están distribuidos ampliamente y de manera diferente en el sistema nervioso central, ellos actúan como se menciona anteriormente como neuromoduladores y neurotransmisores, mostrando una importante influencia en muchos estados fisiológicos y patológicos, incluyéndolos en funciones cardiovasculares y gastrointestinales, los opiáceos también disminuyen el sistema respiratorio y puede causar hiperglicemia y acinesia (Strand, 1999).

Los principales opiáceos endógenos son las endorfinas, las encefalinas y las dinorfinas, los cuales son codificados por tres genes separados.

## **Endorfinas**

Las endorfinas son originadas de la Proopiomenlanocortina (POMC), una proteína de 267 aminoácidos, de la cual derivan diferentes tipos de endorfinas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - endorfina, las cuales se diferencian en la cantidad de aminoácidos. Las  $\beta$ -endorfinas se localizan en dos grupos celulares en el

cerebro: en el núcleo arcuato del hipotálamo y en el núcleo del tracto solitario (Schafer et al, 1991; Simon y Hiller, 1994).

## **Enkefalinas**

Las enkefalinas son péptidos de diferentes tamaños, que derivan de la Proencefalina A. Este precursor da origen a dos tipos de pentapéptidos, diferenciándose solamente de su C-terminal; leucina (leu-enkefalina) o metionina (met-enkefalina). La proencefalina contiene una copia de leu-enkefalina, cuatro de met-enkefalina, un heptapéptido, y un octapéptido (Simon y Hiller, 1994).

Las proencefalinas se encuentran en la corteza cerebral, ganglios basales, hipotálamo, tálamo, espina dorsal, pituitaria posterior y anterior, en el sistema límbico, núcleo acumbens y la amígdala. También se encuentran en varios tejidos periféricos tales como la medula adrenal y sistema reproductivo (Schafer et al, 1991).

## **Dinorfinas**

Son derivadas de la Prodinorfina o proencefalina B un péptido de 256 aminoácidos, es el precursor de  $\alpha$ -neo-endorfina,  $\beta$ -neo-endorfina, dinorfina A-(1-8), dinorfina A-(1-17) y dinorfina  $\beta$ . Las prodinorfinas están ampliamente distribuidas en todo el cerebro, su distribución es similar con las proencefalinas, pero con algunas diferencias. El pálido ventral está densamente innervado por fibras y células que contienen dinorfina, mientras que los globos pálidos son ricos en enkefalinas.

## **Receptores a opiáceos**

La acción biológica de las sustancias químicas ocurre a través de la interacción con sus distintas clases de receptores que se encuentran en las terminales nerviosas. Mediante estudios de biología celular, e inmunocitoquímica se ha encontrado, que los opiáceos endógenos inducen su efecto por la interacción con tres principales clases de receptores, Mu ( $\mu$ ), Delta ( $\delta$ ) y Kappa ( $\kappa$ ), estos receptores son de tipo metabotrópico ya que están acoplados a proteínas-G, ligados directamente a canales iónicos

ó a segundos mensajeros, por lo que su acción se considera lenta (Reisine y Brownstein, 1994; Cooper et al, 1996; Dhawan et al, 1996; Lord et al, 1977; Aidley, 1998). Los receptores a opiáceos fueron nombrados por el prototipo de droga usada con la cual el receptor se ligo: Así se denominó receptor  $\mu$  por morfina, Kappa por ketocyclazocine, sin embargo el receptor delta fue nombrado así debido a que este receptor predomina en los vasos deferentes.

### **Receptor Mu $\mu$**

El receptor  $\mu$  muestra una alta afinidad por la morfina y una menor afinidad para la encefalina. Está ampliamente distribuido en el cerebro, principalmente a nivel postsináptico y en ocasiones se puede encontrar presinápticamente (Ding et al, 1996). Se han encontrado altos niveles de mRNA para el receptor  $\mu$  en el tálamo, estriado, locus coeruleus, y el núcleo del tracto solitario. Este receptor está involucrado en procesos de información sensorial (Reisine y Brownstein, 1994; Strand, 1999).

### **Receptor Delta $\delta$**

Las met-enkefalinas y leu-enkefalinas son los ligandos endógenos del receptor  $\delta$  (Hughes et al, 1975). Este receptor es más limitado en su distribución en las áreas sensoriales del cerebro que el receptor  $\mu$ , está altamente concentrado en la corteza, el estriado, área reticular lateral, por lo que se supone que ellos están involucrados en la integración de la información sensoriomotora (Strand, 1999).

Se establece que el receptor  $\delta$  inhibe los niveles de cAMP y modulan la actividad de canales de calcio y potasio dependientes de voltaje (Quock et al, 1999).

De los tres tipos de receptores, la distribución del receptor  $\delta$  parece ser el más conservado a través de las especies de mamíferos. El receptor  $\delta$  se encuentra densamente en las estructuras del cerebro anterior y disminuye hasta desaparecer en las áreas del cerebro medio y tallo cerebral. Esta relación es particularmente evidente en el sistema nigroestriatal donde los ligandos para el receptor  $\delta$  se presentan de moderados a densos, observados en el caudado-putamen (neostriado) de rata, cobayo, hámster y monos. Los ligandos de receptores son equitativamente uniformes en todo el caudado y

putamen con marcas más densas en la parte lateral de estos núcleos. Los ligandos al receptor  $\delta$  se extienden hacia el estriado ventral, dentro de estas especies se presentan niveles moderados a densos en el núcleo acumbens y tubo olfatorio. Mas caudalmente, en el pálido, los niveles de ligandos de receptores  $\delta$  son marcadamente reducidos comparados con el estriado y parece no existir en la sustancia nigra y área tegmental ventral (Mansour et al, 1991).

## **Receptor Kappa $\kappa$**

El receptor  $\kappa$  muestra alta afinidad para el péptido dinorfina. Estos receptores representan aproximadamente el 10% del total de los sitios de ligando para opiáceos en el cerebro de rata y se encuentran en altas concentraciones en el núcleo acumbens, sustancia nigra, área tegmental ventral y en el núcleo del tracto solitario. El receptor Kappa es el tipo de receptor que predomina en el hipotálamo y también esta presente en el lóbulo neural e intermedio de la pituitaria. Están involucrados en importantes funciones como la antinocicepción, regulación hormonal, funciones nigroestriatales y control de respuestas viscerales. Se cree que también están involucrados con los procesos de información sensorial pero mucho menos que los receptores  $\mu$  (Strand, 1999).

## **Distribución de los péptidos opioides en el sistema nervioso central.**

Los péptidos opioides son abundantes en muchas regiones del sistema nervioso central (Cuello, 1978) como son, el hipocampo (Simmon y Chavkin, 1996), el neostriado (Graybiel, et al, 1981), el globo pálido externo, el globo pálido interno, el tálamo, y la corteza, donde juegan un papel muy importante en la neurotransmisión de áreas relacionadas con el dolor y la actividad locomotora. También se encuentran en el núcleo del tracto solitario, el núcleo arcuato; y el locus coeruleus, bulbo, hipotálamo, amígdala, septo y medula espinal (Cuello, 1978). El neostriado es uno de los núcleos con altos niveles de péptidos opioides (Jiang y North, 1992).

Las drogas opioides (llamados opiáceos) y péptidos endógenos (opioides), han sido relacionadas con diferentes funciones como son: el control del dolor (Jaffe y Martin, 1990), mecanismos de estrés, la regulación respiratoria, el control de la temperatura, el comportamiento sexual, el sistema locomotor, la memoria y el desarrollo de tolerancia y dependencia física.

En el sistema endocrino están relacionados con el incremento de liberación de la hormona de crecimiento, prolactina y hormona antidiurética, disminución de los niveles de trirotropoyetina, hormona leutinizante y hormona folículo estimulante. También se ha establecido que participan en la regulación de diferentes neurotransmisores (Cuello, 1978).

### **Papel funcional de los receptores a opiáceos**

Desde su descubrimiento en 1973 los receptores opioides han sido el foco de intensa investigación con la finalidad de conocer su función en la neurotransmisión y adicción (Pert y Zinder, 1973; Mansour et al, 1995). Los tres tipos de receptores a opiáceos interactúan con proteínas-G (Childers, 1991; Standifer y Pasternak, 1997). Han sido implicados en un amplio rango de comportamientos y funciones incluyéndolos en la regulación del dolor, refuerzo y recompensa, liberación de neurotransmisores, modulación neuroendocrina, inhibición de la adenilato ciclasa, activación de conductancias de potasio, inhibición de conductancias de calcio y la inhibición de la liberación del transmisor. En el sistema nervioso central los opiáceos tienen dos acciones celulares; la primera es hiperpolarizar a las células incrementando conductancias de potasio, y segundo, inhiben la transmisión sináptica reduciendo corrientes de calcio dependientes de voltaje (North, 1993; Shen y Johnson, 2002).

La consecuencia de la apertura de canales de potasio es inhibir el disparo celular; tal acción sobre la neurona en la vía de la transmisión del dolor probablemente produce la acción analgésica del opióide. La consecuencia de reducir las corrientes de calcio es menos entendida pero puede incluir inhibición presináptica así como disminuir el efecto directo sobre el metabolismo intracelular tal como

la alteración en el estado de fosforilación de una proteína. En ese sentido, los opioides inhiben el disparo de neuronas en muchas regiones del sistema nervioso de mamíferos.

La inhibición directa del potencial de acción resulta de una hiperpolarización de la membrana; la membrana se hiperpolariza debido a una serie de canales de potasio que se abren (North, 1986).

Los tejidos en los cuales esta acción se ha mostrado incluyen al *locus coeruleus* (Pepper y Henderson, 1980), plexo mienterico (Morita y North, 1982), plexo submucoso (Mihara y North, 1986), y hipotálamo (Charpak et al, 1988) del cobayo; en el *locus coeruleus* (Williams et al, 1982; North y Williams, 1985; North et al, 1987), sustancia gelatinosa (Yoshimura y North, 1983), *parabrachialis* (Christie y North, 1988), interneuronas de hipocampo (Madison y Nicoll, 1988), y sustancia nigra en neuronas secundarias (Lacey et al, 1989) de la rata; y en las células de la raíz dorsal del ratón (Werz y Macdonald, 1983).

Un incremento en las conductancias de potasio en las terminales nerviosas puede producir una disminución de la duración del potencial de acción (como se muestra en el cuerpo celular por receptores  $\mu$  y  $\delta$ ) (North y Williams, 1983; Werz y Macdonald, 1983), y aumentar la liberación del transmisor.

El efecto de la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  sobre conductancias de  $K^+$  es de interés ya que estas corrientes pueden hiperpolarizar las neuronas haciéndose menos sensibles a los neurotransmisores y regresar al potencial de membrana de reposo después de un disparo (Quock et al, 1999).

Las conductancias activadas tanto por el receptor  $\mu$  (en el locus coeruleus de rata) y receptores  $\delta$  (en el plexo submucoso del cobayo) presentan propiedades macroscópicas similares. Ellos muestran rectificación entrante, y son muy sensibles al bario externo. Estas propiedades son similares a esas conductancias de potasio rectificadores entrantes que han sido ampliamente caracterizados en las

células del huevo, músculo esquelético, y neuronas (Hille, 1994), excepto que las conductancias son activadas a potenciales menos negativos.

Los rectificadores entrantes no están significativamente abiertos hasta potenciales de membrana próximos al potencial de equilibrio para el potasio ( $E_K$ ), entonces juegan un importante papel en la célula la cual normalmente tiene un potencial de reposo muy cercano al  $E_K$ . Las neuronas en las cuales los opiáceos causan un incremento de largas conductancias normalmente tienen un potencial de reposo alrededor de los  $-55$  a  $-65$  mV, potenciales en los cuales los rectificadores retardados no están significativamente activados. Sin embargo, estos potenciales están cerca del punto medio para la activación de las conductancias que se abren en presencia de opioides, asegurando que estos agonistas pueden causar una hiperpolarización significativa (Williams et al, 1988).

Los receptores a opiáceos son probablemente receptores presinápticos, que cuando se activan, alteran la cantidad de la liberación del transmisor, por lo que su acción frecuentemente se refiere como moduladores de la acción sináptica (Reisine y Brownstein, 1994; Cooper et al, 1996; Thorlin et al, 1997; Kandel, 2000).

### **Modulación sináptica por opiáceos**

Mediante el empleo de técnicas de registro intracelular *in vitro* en el estriado de rata se ha mostrado la acción presináptica y postsináptica por los opiáceos, donde se ha sugerido que la principal acción de los opiáceos sobre neuronas estriatales es la inhibición presináptica de las entradas sinápticas excitatorias corticoestriatales. La reducción del potencial sináptico (40 %) por opiáceos se interpreta como una inhibición de la liberación del glutamato desde las fibras corticales (Jiang y North, 1992).

La inhibición presináptica de la liberación de aminoácidos excitatorios a través de receptores  $\delta$  previamente fue reportada en el estriado de rata (Jiang y North, 1992; Yuan et al, 1992).

El uso de agonistas a receptores  $\delta$  y  $\mu$  sobre corrientes postsinápticas excitatorias y propiedades de la membrana en neuronas neocorticales, han mostrado que la activación de receptores a opiáceos  $\mu$  y

$\delta$  disminuyen la transmisión excitatoria glutamatérgica provocada en neuronas neocorticales exclusivamente por inhibición presináptica de la liberación de glutamato, mediado probablemente por bloqueo de los canales de calcio presinápticos, aunque también se ha observado una débil activación de conductancias de potasio postsinápticas, pero solamente a altas concentraciones del agonista opiáceo (Andreas et al, 2000).

Por otro lado, en las terminales axónicas se presenta preferentemente el receptor opiáceo tipo  $\delta$  (DOR), sugiriendo un papel primario de estos receptores sobre la modulación de la transmisión sináptica corticoestriatal, mediante la modulación presináptica de la liberación del transmisor. Estas observaciones tienen importantes implicaciones para la comprensión del papel funcional de los DOR en comportamientos adaptativos y adicción a drogas (Wang y Pickel, 2001).

El incremento en las conductancias de  $K^+$  y la disminución de las de  $Ca^{2+}$  trae como consecuencia la inhibición del disparo y la reducción de la excitabilidad de la membrana, además de disminuir la liberación del transmisor (North, 1986; North, 1993).

Estudios electrofisiológicos han demostrado que la activación de receptores  $\mu$  y  $\delta$  disminuyen la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria por la reducción de la liberación de glutamato y GABA respectivamente de las terminales presinápticas. (Jiang y North, 1992; Schlosser, et al, 1994).

En previos trabajos se ha observado que la activación de receptores tipo  $\delta$  hiperpolarizan algunas neuronas piramidales en la corteza prefrontal como resultado de un incremento en las conductancias de  $K^+$ , al igual que también inhiben presinápticamente la liberación de aminoácidos excitatorios (Tanaka y North 1994), como en otras neuronas (cobayo, plexo submucoso, Mihara y North, 1986; células granulosas del giro dentado de la rata (Piguet y North, 1993).

En muchas partes del SNC y del sistema nervioso periférico los opiáceos reducen la liberación de neurotransmisores (Iles, 1989), sin embargo no resulta claro si la inhibición de la liberación del neurotransmisor es causada por el efecto de canales potasio y calcio (e.g.Cohen et al, 1992).

El estudio de la modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas en el neostriado de rata es de gran interés, ya que de estas entradas glutamatérgicas depende el inicio de los mecanismos de la regulación de la función motora del neostriado (Albin et al, 1990; Wilson, 1998). Sin embargo también hay que tomar en cuenta que las entradas sinápticas glutamatergicas a las neuronas estriatales son moduladas por diversos neurotransmisores y neuropéptidos, de los cuales muchos de sus receptores son blancos de drogas de abuso (Gederman et al, 2003).

## **Objetivos**

El mecanismo por el cual se produce modulación presináptica en la sinapsis corticoestriatal a través de la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  aún no ha sido comprendido en su cabalidad. Los resultados en el laboratorio demostraron que solamente de manera parcial los canales de calcio están involucrados en la modulación, esto nos llevo a realizar el presente trabajo con el fin de determinar si los canales de potasio que se encuentran presentes pudieran estar involucrados en la modulación. Por lo que el propósito del presente trabajo consistió en determinar si la liberación del glutamato en esta sinapsis corticoestriatal es modulada por la activación de conductancias de potasio, a través de la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$ , que probablemente se encuentran en las aferentes corticales. Por lo que se propone los siguientes:

### **Objetivo General**

- Establecer el papel de los canales de potasio en la modulación presináptica producida por la activación de los receptores a opiáceos tipo delta.

### **Objetivos Particulares**

- Demostrar que los canales de potasio producen modulación presináptica.
- Determinar la modulación presináptica por la activación de receptores a opiáceos tipo delta.
- Establecer la relación entre la modulación presináptica por canales de potasio y la activación de receptores a opiáceos tipo delta.

# Material y Métodos

## Organismos

Se utilizaron ratas macho Wistar de 100 a 120 g de peso, bajo anestesia se extrajo el cerebro y se colocó en solución salina isotónica (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucosa, 0.2 mM tiourea y 0.2 mM ascorbato), en presencia de 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>; mantenida a un pH de 7.4. y una temperatura de  $4 \pm 1$  °C. Se obtuvieron las rebanadas sagitales de cerebro de 400 µm de espesor con un vibratomo (Campden Instrument, UK). Las rebanadas fueron colocadas y mantenidas en incubación en solución salina isotónica a temperatura ambiente. En estas condiciones el registro se inició aproximadamente después de una hora a partir de la última rebanada obtenida.

## Estimulación y Registro de potenciales de campo

La rebanada se colocó en la cámara de registro a la cual se le hizo pasar una perfusión constante de solución salina  $1.0 \pm 0.1$  ml/min previamente gaseada, estas condiciones se mantuvieron a lo largo de todo el experimento.

Se utilizaron electrodos de estimulación concéntricos bipolares de 200-500 µm en la punta, el cual se colocó entre el cuerpo calloso y el estriado, de esta manera se estimularon las fibras corticales aferentes al neocórtex. Los estímulos se mandaron por medio de un estimulador (GRASS S88), pasándolos a través de una unidad aisladora (Digitimer DS2) en donde se reguló la intensidad (0 - 25 V), la duración (0.01 - 0.04 ms) y la frecuencia (0.4 - 0.06 Hz).

Los potenciales de campo fueron registrados mediante microelectrodos de vidrio obtenidos a partir de capilares de vidrio de borosilicato estirados por calentamiento, de 1.0 mm de diámetro externo; con una resistencia de 2 - 4 MΩ, con NaCl al 0.9 % utilizada como sustancia conductora.

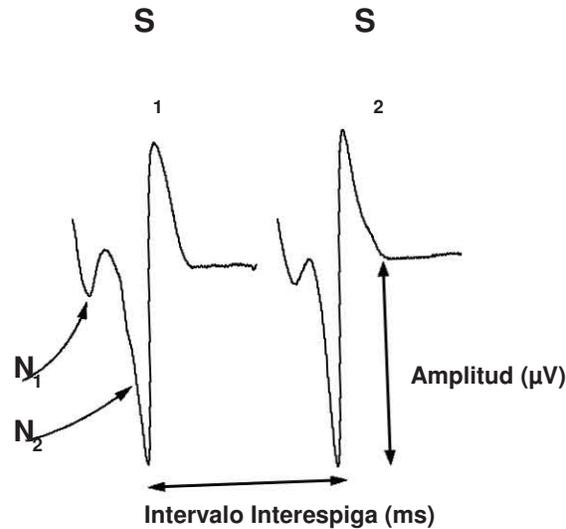
El electrodo de registro se colocó dentro del cuerpo estriado siguiendo las estrías y en paralelo al electrodo de estimulación a una distancia de aproximadamente 1 a 2 mm dependiendo de la actividad observada.

El potencial de campo se amplificó (P55, Grass Instrument CO. Warwick, RI. U.S.A), se desplegó al osciloscopio (Tektronix 5223), se digitalizó (Instrutech, Long Island, N.Y) y se almacenó en video VHS, utilizando el software comercial Labview (National Instruments, Austin, TX, U.S.A).

Los registros así obtenidos se midieron, promediaron y graficaron utilizando software comercial (Origin, Microcal Software, Northampton, MA. U.S.A.)

### **Potenciales de campo**

Los potenciales de campo son registros extracelulares de corrientes iónicas que atraviesan la membrana por la llegada de un estímulo, esto ocasiona un cambio en el potencial de la membrana asociado a la actividad de una población de neuronas. Esta actividad extracelular es registrada y se observa en forma de espigas poblacionales debido a la sincronía de muchos potenciales de acción. El potencial de campo registrado es una onda trifásica, producida por la diferencia del potencial, por lo que en el registro extracelular las corrientes entrantes de sodio se observan como deflexiones negativas; mientras que las corrientes salientes de potasio se observan como deflexiones positivas. El componente negativo de la espiga corresponde a la depolarización de la membrana neuronal y el componente positivo a la repolarización de la membrana, mientras que la amplitud de la espiga va depender de la respuesta sincrónica de las poblaciones que están siendo estimuladas, así como por la cantidad de transmisor liberado. En este sentido las entradas sinápticas excitatorias que dan lugar a una corriente entrante en las dendritas producen en el soma corrientes salientes pasivas que cambian en un lapso de tiempo, por lo que es común obtener ondas trifásicas, que representan la propagación del potencial de acción (Johnston y Wu, 1995).



**Figura 4.** Registro extracelular de un potencial de campo en el estriado de rata. En el registro del potencial de campo se observan dos negatividades ( $N_1$  y  $N_2$ ) la primera es en respuesta al potencial antidrómico que corresponde a la información que va del axón a las dendritas y que aparece primero en el registro, aproximadamente de 2 a 4 ms después del artefacto de estimulación. La segunda deflexión corresponde al potencial sináptico que aparece en el rango de 4 a 8 ms, y se obtiene cuando las aferentes corticales que llegan al árbol dendrítico o al soma de la neurona estriatal generan un potencial postsináptico Figura 4 (Malenka y Kocsis, 1988). Por otro lado se muestran dos registros ( $S_1$  y  $S_2$ ) separados por un intervalo de tiempo, para observar la facilitación por pulso pareado a través del cambio en las amplitudes de la espiga.

### Facilitación por pulso pareado.

Para evaluar los eventos presinápticos se emplean técnicas electrofisiológicas indirectas, ya que no es posible introducir un electrodo de registro en las terminales. En este trabajo se utilizó el paradigma experimental de facilitación por pulsos pareados (FPP), que ha sido utilizada por un sin número de investigadores para estudiar eventos presinápticos (Dunwiddie y Hass, 1985; Mennerick y Zorumski, 1995; Isaacson y Walmsley, 1995; Hernández–Echeagaray, 1998; Barral et al, 1999, 2000, 2001, 2003;). Para el protocolo de facilitación por pulso pareado se mandan dos estímulos ( $S_1$  y  $S_2$ ), cercanos en el tiempo (10 – 200 ms) (Barral et al, 2001). La primera respuesta al primer estímulo es el componente  $S_1$  (condicionante) y la segunda  $S_2$  (condicionado) Figura 4 (Dunwiddie y Hass, 1985; Hernández –Echeagaray, 1998; Barral et al, 1999; 2000).

Cuando las fibras aferentes cortico-estriatales son estimuladas a intervalos interestímulo cortos la respuesta de la segunda espiga poblacional ( $S_2$ ) se ve facilitada (aumenta su amplitud) con respecto a la primera ( $S_1$ ).

El principio de la facilitación se fundamenta con la hipótesis de calcio residual propuesta por Katz y Miledi (Katz y Miledi, 1968, 1970; Kamiya y Zucker, 1994; Aidley, 1998), ya que los iones calcio intervienen en el proceso de liberación del transmisor. Esta hipótesis plantea: que si hay un incremento en la concentración de calcio intracelular por cada estímulo depolarizante, entonces, habrá mayor liberación del transmisor al siguiente estímulo (Charlton et al, 1982; Zucker, 1999); debido a que no todo el calcio que entra es utilizado en el proceso de liberación al primer estímulo. Este calcio “residual” se suma al calcio que entra al segundo estímulo incrementando la probabilidad de fusión de las vesículas (Parnas et al, 1982; Bargas et al, 1998) que contienen el transmisor. Por tanto al utilizar el protocolo de FPP se observa un aumento en la amplitud del sináptico  $S_2$  (Katz y Miledi 1968, 1970), respecto a la amplitud del sináptico  $S_1$ . Sin embargo, la amplitud de la respuesta al segundo estímulo está en función de la amplitud de la primera respuesta; entonces si la probabilidad de liberación en la primera respuesta ( $S_1$ ) es elevada, la probabilidad de liberación en la segunda respuesta ( $S_2$ ) será baja (Debanne et al, 1996).

### **Protocolo experimental**

Para buscar la actividad neuronal, se aplicaron dos estímulos con una intensidad inicial de 20 V, una duración de 0.4 ms y a una frecuencia de 0.5 Hz. Como el estriado no tiene un arreglo laminar la posición de los electrodos fue diferente en cada registro obtenido. Una vez obtenido el registro se disminuye la frecuencia del estímulo a 0.1 Hz para obtener un registro estable, por lo que a esta frecuencia de disparo se mantuvieron todos los experimentos realizados.

Los experimentos se realizaron en presencia de bicuculina 10  $\mu\text{M}$  que es un bloqueador específico del receptor  $\text{GABA}_A$ , para eliminar el componente inhibitorio y obtener solo el componente glutamatérgico (Bargas, et al, 1998; Barral et al, 2001, 2003; Nisenbaum et al, 1992). En estas condiciones, la intensidad de los estímulos se ajustó para ver poca o ninguna facilitación ( $S_2/S_1 \approx 1$ ) en el tiempo de registro durante el control. Esto permitió detectar los cambios provocados por la administración del agonista a los neuromoduladores, así como aquellos cambios provocados por los bloqueadores de potasio, y determinar el cambio en la facilitación la cual se evaluó como el cociente entre la amplitud de la respuesta al segundo estímulo ( $S_2$ ) entre la respuesta al primer estímulo ( $S_1$ ):

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

que expresado en porcentaje queda:

$$\%FPP = 100 \bullet \left[ \frac{S_2}{S_1} - 1 \right] \quad (1)$$

## Fármacos Utilizados

Para determinar farmacológicamente si la activación de receptores delta produce inhibición presináptica mediada por los canales de potasio, se emplearon péptidos específicos de estos receptores; como el DPDPE (D-Pen2, D-Pen5) encefalina, donde Pen = penicilamina. Se realizaron experimentos de oclusión farmacológica utilizando bloqueadores no específicos de canales de potasio; Tetraetilamonio (20  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ), 4-Aminopiridina (1  $\mu\text{M}$ ), Bario (400  $\mu\text{M}$ ) y Cesio (5 Mm).

Las drogas y bloqueadores utilizados se disolvieron en la solución y se administraron a través del dispositivo de perfusión.

## **Análisis de Datos**

La significancia estadística de los cambios observados con el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP), se examinó en cada experimento, con el mismo tejido siendo su propio control. Se tomaron muestras de datos antes y después de la aplicación del DPDPE y/o la aplicación de los bloqueadores de canales de potasio. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar. Se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas (U de Mann-Whitney) para determinar la significancia. Los cambios en la FPP se expresaron en porcentajes y todas las muestras fueron comparadas con las otras usando análisis de varianza para datos no paramétricos Kruskal-Wallis (Brown y Rothery, 1993; Daniel, 2002).

## Resultados

En el presente trabajo se muestra la modulación presináptica de las aferentes corticoestriatales por la activación de receptores a opiáceos tipo delta. Los cuales actúan sobre conductancias de potasio en la terminal glutamatérgica, regulando la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal.

### A) Protocolo de pulso pareado

En primer término se considero importante demostrar que el protocolo experimental utilizado en el presente trabajo de Tesis es adecuado para el estudio de los eventos presinápticos. Por lo que la figura 5 muestra como la manipulación experimental de los canales de potasio y calcio, modifican el valor del cociente  $S_2/S_1$  (facilitación por pulso pareado), de acuerdo a la “Hipótesis del Calcio Residual” propuesta por Katz y Miledi a finales de la década de los 60’s (Katz y Miledi, 1968; 1970). Este protocolo ha sido utilizado junto con el registro extracelular, siendo muy sensible para detectar los eventos presinápticos. (Barral et al 2000; 2001; 2003).

La figura 5 muestra la forma como se utilizo el protocolo de pulso pareado en un experimento representativo. En el panel A se observa el curso temporal de un experimento donde se aplicaron bloqueadores no específicos tanto de canales de potasio como de calcio. Las barras horizontales indican el tiempo de perfusión de los antagonistas durante el experimento. Los registros mostrados en el panel B corresponden a los números indicados en la gráfica del panel A. Para este tipo de protocolos experimentales, se aplican dos estímulos de igual intensidad separados por un intervalo de tiempo de 10-200 ms con el fin de determinar la facilitación por pulso pareado (FPP); tal y como se observa en los registros electrofisiológicos del experimento mostrado (Fig. 5B). La porción del trazo correspondiente al artefacto del estímulo fue suprimida digitalmente. La FPP se evaluó como el cociente entre la amplitud (tomada de la basal al pico) de la respuesta al segundo estímulo ( $S_2$ ) entre la respuesta al primer estímulo ( $S_1$ ) y se tomo el promedio de cinco minutos de registro (Fig. 5A), de modo que por medio de esta manipulación farmacológica de los canales iónicos ( $Ca^{2+}$  y  $K^+$ ), es

evidente que se encuentran presentes en las terminales corticoestriatales, ya que produjeron cambios en la FPP.

### **Efecto del bloqueo de canales de Potasio**

La mayoría de las conductancias de  $K^+$  se bloquean por la aplicación extra- o intracelular de  $Ba^{2+}$  (Bertrand, et al, 2003; Hille, 2001; Coetzee, et al, 1999), por lo que se decidió utilizar este ión para determinar el cambio en la FPP producido por el bloqueo de canales de potasio.

En primer termino, se puede apreciar una disminución en la FPP con respecto a la condición control después de bloquear las conductancias de potasio con  $Ba^{2+}$  (400  $\mu$ M) tal y como se observa al inicio del experimento (Fig. 5).

### **Efecto del bloqueo de los canales de Calcio**

Por otro lado cuando se bloquean las conductancias de calcio (p.Ej. con  $Cd^{2+}$ ) la facilitación aumenta con respecto al efecto del bario (Fig. 5A). Observe que en condiciones control, la amplitud al segundo estímulo aumenta con respecto a la amplitud al primer estímulo y que después de la aplicación del  $Ba^{2+}$  (400  $\mu$ M) al medio extracelular la amplitud al segundo estímulo disminuyo en comparación a la amplitud al primer estímulo. Sin embargo observe que cuando las conductancias de calcio se bloquean tanto la amplitud  $S_2$  como la  $S_1$  disminuyen, lo que sugiere una menor liberación de glutamato al medio extracelular.

La FPP disminuye cuando las conductancias de  $K^+$  son bloqueadas, posiblemente se deba a que con la llegada del potencial de acción (o el estímulo en nuestro caso) la terminal se despolariza. Como los canales de potasio están cerrados, por la acción del bario, la terminal permanece más tiempo despolarizada, y por lo tanto los canales de calcio, sensibles al voltaje permanecen más tiempo abiertos. Por lo que al estar bloqueadas las conductancias de  $K^+$ , permiten una mayor entrada de calcio. Este fenómeno permite que aumente la probabilidad de liberación del transmisor que se refleja como un aumento en la amplitud al primer estímulo, mientras que al segundo estímulo la probabilidad de

liberación disminuye de acuerdo a la hipótesis del calcio residual, esto se debe a que con el segundo estímulo continua entrando calcio a la terminal, pero ya no hay suficientes vesículas ancladas y disponibles para liberar, por lo que disminuye la liberación.

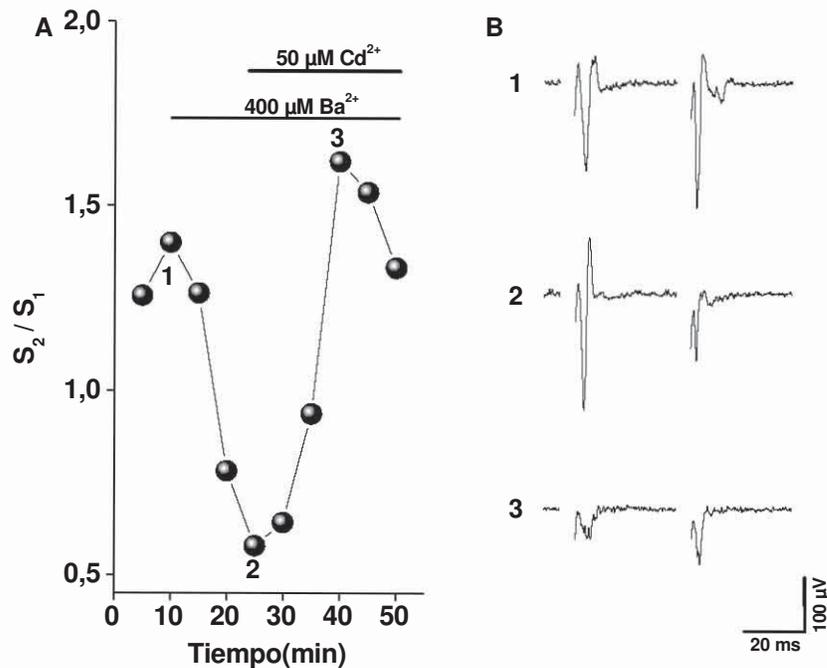
Por otro lado el aumento en la FPP cuando las conductancias de calcio se bloquean se debe principalmente a que la liberación del transmisor depende directamente de la entrada de calcio. Por lo que cuando se bloquea la entrada de calcio, disminuye la cantidad de neurotransmisor liberado, que se observa como una disminución en la amplitud del componente  $N_2$  del registro de campo (sináptico). Llama la atención que el incremento en la FPP se verifique aun a pesar de estar bloqueados los canales de potasio (Fig. 5) lo que sugiere que la acción de cada uno de estos canales es independiente de la acción de los otros.

Vale la pena hacer notar que aún cuando cambien las amplitudes del sináptico por las manipulaciones experimentales, ya sea aumentando (canales de potasio) o disminuyendo (canales de calcio) el evento presináptico se observa como el cambio en el cociente de las amplitudes  $S_2$  y  $S_1$ . De tal modo que si no ocurre un cambio en la FPP por la manipulación experimental, esto se debe a que muy probablemente se trata de un evento postsináptico.

Con base a lo anterior se puede decir que las conductancias de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  que se encuentran en las terminales corticoestriatales tienen diferentes funciones, pero las dos conductancias participan en el proceso de la liberación del transmisor; en este caso del glutamato. Esto es importante ya que si alguna condición altera su funcionamiento, indirectamente repercutirá en la liberación del transmisor. Nuestros resultados muestran que el bloqueo total o parcial de las diversas conductancias de  $K^+$  produce un aumento en la probabilidad de liberación del transmisor que se refleja como una disminución en la facilitación por pulso pareado.

## **B) Modulación presináptica por receptores a opiáceos tipo $\delta$**

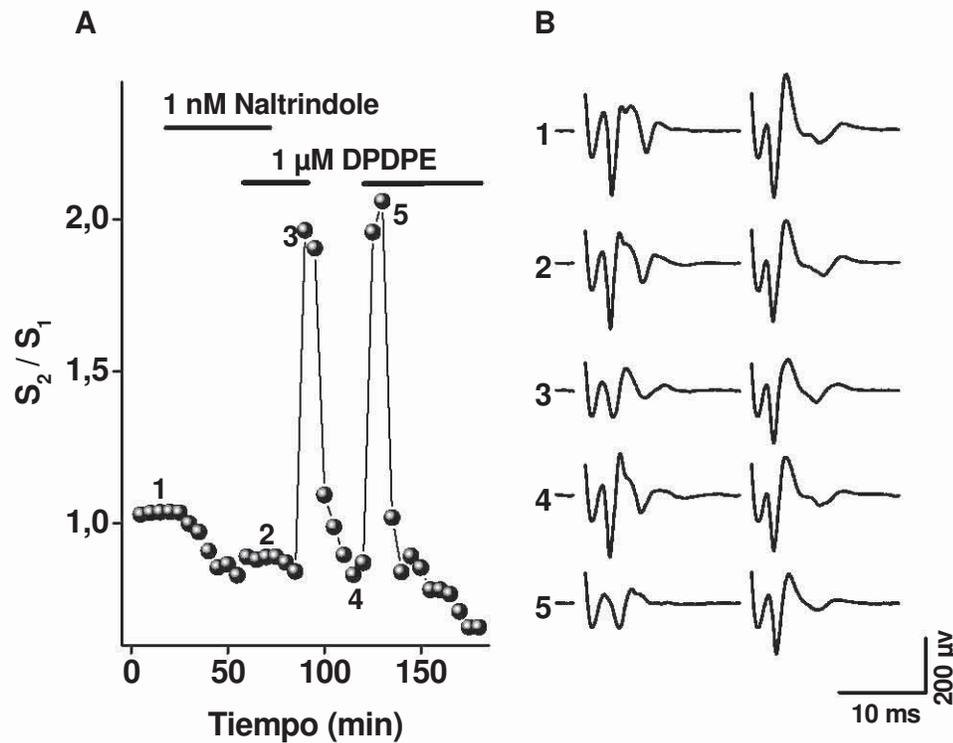
Para demostrar que los receptores a opiáceos tienen efectos inhibitorios como se ha reportado anteriormente, en el presente trabajo se muestra que la activación de los receptores a opiáceos en este caso los receptores tipo  $\delta$  juegan un importante papel en la modulación presináptica corticoestriatal. Al aplicar al medio extracelular el DPDPE (1  $\mu$ M) esperábamos ver un aumento en la facilitación por pulso pareado, lo que reflejaría una disminución en la liberación del transmisor glutamato. Se utilizó naltrindole como antagonista y el DPDPE como agonista, de los receptores a opiáceos tipo  $\delta$ . En la figura 6A se ilustra el curso temporal de un experimento en el cual se observa el cambio en la FPP producida en primer término por el efecto del naltrindole, notese que al aplicar el naltrindole (1 nM), durante determinado tiempo (barra horizontal) el cociente entre las amplitudes  $S_2/S_1$  tiende a disminuir; o sea hay una disminución en la FPP. Sin embargo cuando se lava el naltrindole del medio extracelular y se aplica el DPDPE (1  $\mu$ M; barra horizontal) se observa un aumento en la FPP. Posteriormente se lava el DPDPE y la FPP regresa a valores cercanos a las condiciones control.



**Figura 5.** Protocolo de facilitación por pulso pareado. Los canales de potasio y calcio participan en la probabilidad de liberación del transmisor glutamato en las aferentes corticoestriatales. En el panel A se muestra el curso temporal de un experimento; las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de los antagonistas. Al estar bloqueadas las conductancias de  $\text{K}^+$  con Bario ( $400 \mu\text{M}$ ) se produce una disminución en la facilitación por pulso pareado; es decir aumenta la probabilidad de liberación del glutamato, mientras que al estar bloqueadas las conductancias de calcio con Cadmio ( $50 \mu\text{M}$ ) se produce un aumento en la facilitación por pulso pareado; es decir disminuye la probabilidad de liberación del transmisor glutamato. En el panel B se muestra registros de potenciales sinápticos correspondientes a los números en el panel A.

Nuevamente se vuelve a aplicar el DPDPE e inmediatamente se observa el aumento en la FPP por la activación de los receptores tipo  $\delta$ . Después de cierto tiempo de exposición al fármaco, se observa un efecto de desensibilización, que es relativamente común cuando se utilizan agonistas para los receptores a opiáceos. En el panel B se representan los registros extracelulares que corresponden a los números en el panel A. Dos respuestas sinápticas ( $S_1$  y  $S_2$ ) separadas por un intervalo de tiempo 10-200 ms que dependen directamente de la concentración intracelular del calcio (hipótesis del calcio residual), observe que la amplitud cambia en la segunda respuesta ( $S_2$ ). Nuestros resultados muestran

que al activar los receptores tipo delta en la terminal corticoestriatal estos producen un aumento en la FPP =  $73.50 \pm 20.63$  % (mediana 46.72 %; n = 15; P < 0.0001 U de Mann-Whitney).



**Figura 6. Efecto del DPDPE (1 μM).** Inhibición presináptica producida por la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$ . La aplicación de DPDPE produjo un aumento en la FPP =  $73.50 \pm 20.63$  % (mediana 46.72 %; n = 15; P < 0.0001 U de Mann-Whitney). Izquierda: se muestra el cambio en la facilitación por pulso pareado de un experimento utilizando naltrindole (antagonista) y el DPDPE (agonista), de los receptores a opiáceos tipo delta. Derecha: registros de potenciales sinápticos excitatorios correspondientes a los números a la derecha. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de DPDPE y naltrindole.

Estos resultados nos indican que la activación de los receptores tipo  $\delta$  si disminuyen la posibilidad de liberación del glutamato y por lo tanto si participan en la modulación a nivel presináptico sobre las aferentes corticales que llegan al neostriado.

### **C) Participación de los canales de $K^+$ en la modulación presináptica por la activación de receptores tipo $\delta$ .**

Debido a que las conductancias de  $K^+$  están involucradas en regular la liberación del glutamato de las aferentes corticoestriatales, se investigo el efecto extracelular de diferentes antagonistas inespecíficos de estas conductancias como el Tetraetilamonio (TEA: 1 mM y 20 mM), 4-Aminopiridina (1  $\mu$ M), Bario (400  $\mu$ M) y Cesio (5 mM) sobre la FPP.

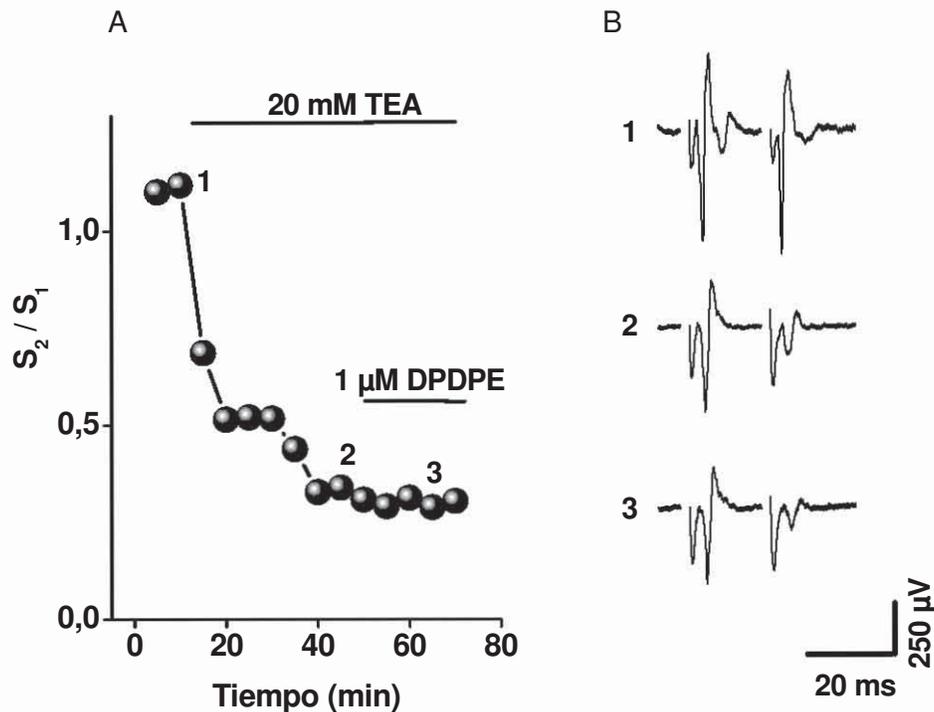
Para determinar si la modulación presináptica producida por la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  ocurre a través de la activación de canales de potasio, se hicieron experimentos de oclusión farmacológica. Se probó el efecto del DPDPE en presencia de los bloqueadores no específicos de las conductancias de potasio. Por lo que si la inhibición presináptica del DPDPE ocurre a través de la activación de algunos canales de potasio entonces el bloqueo de estos canales deberá ocluir la acción del DPDPE.

#### **1) Efecto del DPDPE en presencia de TEA:**

En la figura 7 se muestra primeramente el efecto que tuvo el bloquear las conductancias de potasio después de la aplicación del TEA (20 mM), así como el efecto del DPDPE después de haber bloqueado las conductancias de potasio. En el panel A se muestra el curso temporal de un experimento, la fase experimental se inicia con la aplicación extracelular del TEA (20 mM; barra horizontal) a la solución isotónica después de haber registrado el tiempo que se considero como control. Note como la relación de las amplitudes  $S_2/S_1$  fue disminuyendo por el bloqueo de las conductancias de potasio, esto produjo una disminución en la FPP =  $-32.11 \pm 15.28$  % (mediana = 22.46 %; n = 6; P < 0.05; U de Mann-Whitney) respecto de la FPP que se tenia en condiciones control (FPP =  $1.64 \pm 0.42$  %). El signo negativo nos indica que no hubo facilitación por pulso pareado sino depresión por pulso pareado.

Esta disminución en la FPP nos indica que en las terminales corticoestriatales existen canales de potasio que son sensibles al TEA y que por tanto estos canales participan en la liberación del transmisor.

En el panel B se muestran los registros extracelulares que corresponden a los números en A, el primer registro nos muestra la FPP en condiciones control, note que ambas amplitudes no difieren entre sí, pero después de haber aplicado el TEA la segunda amplitud disminuyó respecto de la primera amplitud, por lo que se infiere que al primer estímulo hay más liberación de transmisor debido al bloqueo de las conductancias de potasio y que a un segundo estímulo esta liberación disminuye por el efecto del calcio residual. Después de haber obtenido el efecto máximo del TEA sin ningún cambio en la FPP se aplicó el DPDPE (1  $\mu$ M) al medio extracelular y lo que se observó fue que la acción del DPDPE (1  $\mu$ M) se ve ocluida completamente después del efecto producido por el TEA (20 mM). El efecto del DPDPE sobre la FPP se vio completamente bloqueado ya que solo produjo un aumento en la FPP =  $7.45 \pm 7.63$  (mediana = 3.8%; n = 6 P < 0.01 U de Mann-Whitney). Después de aplicar el DPDPE se observa que las amplitudes no cambian, esto significa que el efecto del DPDPE sobre la FPP se ocluyó, ya que de manera normal el DPDPE tiende a aumentar la FPP. Estos resultados nos indican que el bloqueo de la mayoría de las conductancias de potasio en presencia de TEA (20 mM) ocluyen completamente la acción del DPDPE y que por lo tanto el efecto inhibitorio producido por la activación de los receptores opioídeos tipo  $\delta$  sobre las aferentes corticoestriatales posiblemente sea a través de la activación de algunas conductancias de potasio sensibles a esta concentración de TEA (20 mM).

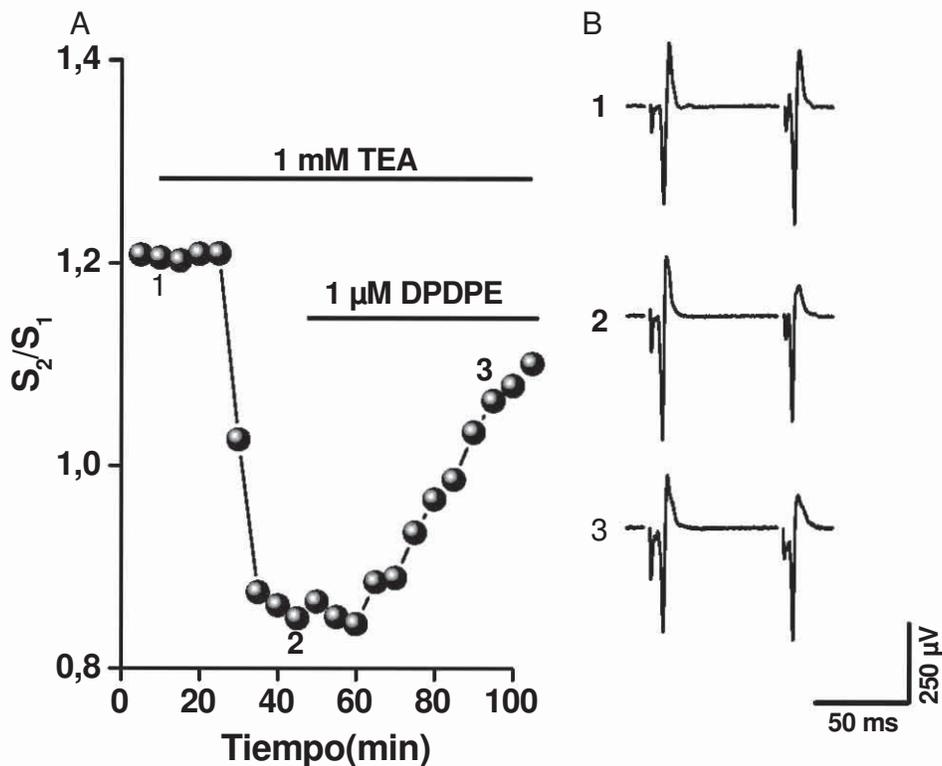


**Figura 7. Efecto del DPDPE en presencia de TEA (20 mM).** Experimentos de oclusión farmacológica, para determinar si el bloqueo de las conductancias de potasio por TEA (20 mM) ocluyen el efecto del DPDPE agonista de receptores a opiáceos tipo  $\delta$ . Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de TEA (20 mM) y DPDPE (1  $\mu$ M). El efecto del DPDPE en presencia de TEA (20 mM) se ve ocluido completamente ya que se produjo un pequeño aumento en la FPP de  $7.44 \pm 7.62$  (mediana 3.8%;  $n = 6$ ;  $P < 0.05$  U de Mann-Whitney). Izquierda: se muestra el curso temporal de un experimento, en el cual se observa que la activación de receptores tipo  $\delta$  en las terminales corticoestriatales no produce un aumento en la facilitación por pulso pareado después de haber sido bloqueadas las conductancias de potasio sensibles al TEA (20 mM) al medio extracelular. Derecha: registros de potenciales sinápticos excitatorios correspondientes a los números a la derecha.

Se ha reportado que la gran mayoría de las conductancias de potasio son sensibles a esta concentración de TEA (20 mM) por lo que se decidió realizar experimentos con concentraciones menores (TEA 1 mM). La Figura 8 muestra experimentos de oclusión farmacológica en la cual se muestra el efecto del TEA (1 mM), así como el efecto del DPDPE (1  $\mu$ M) sobre la FPP después de haber bloqueado los canales de  $K^+$ .

El tiempo inicial de registro se tomo como el tiempo control obteniéndose una FPP =  $2.22 \pm 0.54$  % antes de aplicar los fármacos. Posteriormente se aplico al medio extracelular el TEA (1 mM; barra horizontal) a la solución isotónica. De igual forma se observa que la relación de las amplitudes  $S_2/S_1$  fue disminuyendo por el bloqueo de las conductancias de potasio, sin embargo a esta concentración de TEA se produjo una disminución en la FPP =  $-45.97 \pm 9.65$  % (mediana = 48.41%;  $n= 5$ ;  $P < 0.06$  U de Mann-Whitney). Después de aplicar el TEA (1 mM) se observa que la amplitud al primer estímulo aumenta respecto a la segunda debido al bloqueo de los canales de potasio. Esto nos sugiere que también hay conductancias de potasio que son sensibles a esta concentración de TEA, mismos que están participando en la liberación del transmisor pues su bloqueo incrementa la probabilidad de liberación del transmisor. Cuando ya no se observo un cambio en la FPP en el tiempo de la aplicación del TEA (1 mM), se aplico al medio extracelular el DPDPE (1  $\mu$ M). Se observa que la acción del DPDPE no se ve ocluida en presencia de TEA (1 mM) pues la activación de los receptores  $\delta$  por el agonista produjo un aumento en la FPP =  $62.80 \pm 22.18$ % (mediana = 45.2%;  $n = 5$ ; NS, U de Mann-Whitney). En el experimento se muestra el cambio en las amplitudes a los dos estímulos después de haber aplicado el DPDPE 1  $\mu$ M, note que la amplitud al segundo estímulo aumenta y que la amplitud al primer estímulo disminuye después de la aplicación del DPDPE o sea hay un incremento en la FPP. Una posible explicación en relación al aumento en la FPP por la activación de receptores tipo  $\delta$  después de haber bloqueado algunas conductancias de potasio con TEA (1 mM) se deba a que los receptores  $\delta$  actúen sobre otras conductancias de  $K^+$  que no fueron bloqueadas por bajas concentraciones de TEA (1 mM). Este fenómeno fisiológicamente refleja un efecto inhibitorio o sea disminución en la probabilidad de liberación del transmisor glutamato por la activación de receptores  $\delta$ .

Los resultados experimentales mostraron que la modulación presináptica que estamos estudiando involucra conductancias de potasio que no son sensibles a bajas concentraciones de TEA.



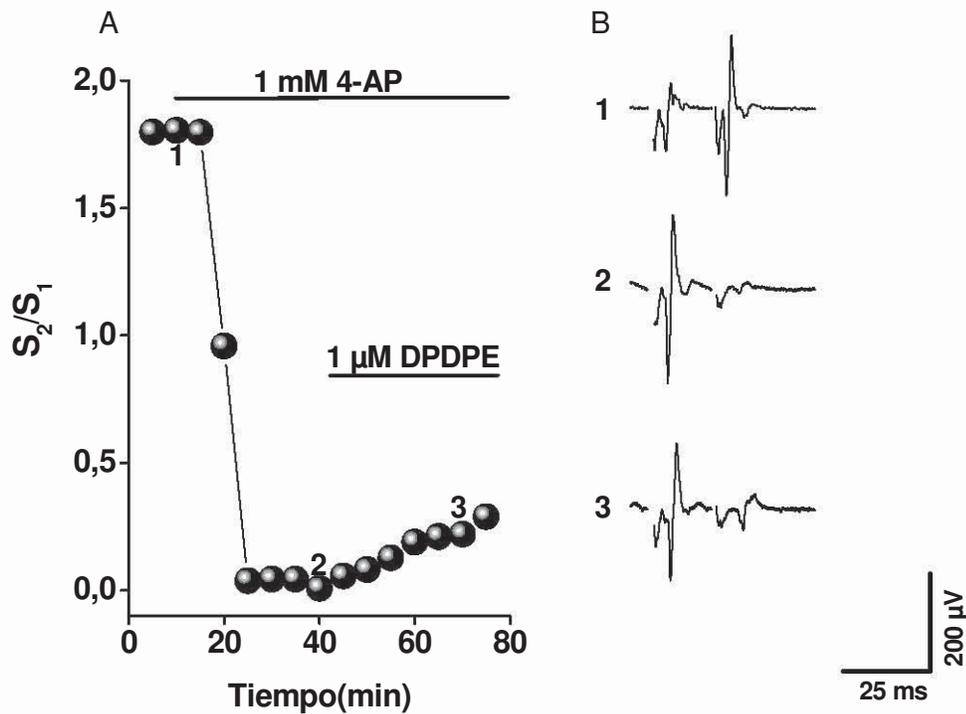
**Figura 8. Efecto del DPDPE en presencia de TEA (1 mM).** Experimentos de oclusión farmacológica, para determinar si el bloqueo de las conductancias de potasio por TEA (1 mM) ocluyen el efecto del DPDPE agonista de receptores a opiáceos tipo  $\delta$ . Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de TEA (1 mM) y DPDPE (1  $\mu$ M). El efecto del DPDPE en presencia de TEA (1 mM) no se ve ocluido de manera total ya que se produjo un aumento en la FPP =  $62.80 \pm 22.18\%$  (mediana 45.2% n = 5; NS, U de Mann-Whitney) Izquierda: se muestra el curso temporal de un experimento, en el cual se observa que la activación de receptores tipo  $\delta$  en las terminales corticoestriatales sigue produciendo inhibición presináptica, aun cuando algunas conductancias de potasio habían sido bloqueadas después de aplicar TEA (1 mM) al medio extracelular. Derecha: registros de potenciales sinápticos excitatorios correspondientes a los números a la derecha.

## 2) Efecto del DPDPE en presencia de 4-Aminopiridina:

Debido a que no todas las conductancias de potasio se bloquean con los antagonistas inespecíficos, se decidió utilizar la 4-aminopiridina ya que se ha reportado que bloquea al igual que bajas concentraciones de TEA las conductancias de potasio tipo BK y las corrientes transitorias rápidas, como es el caso de la corriente A (Coetzee et al, 1999).

En la Figura 9A se observa que la relación de las amplitudes ( $S_2/S_1$ ) disminuye después de aplicar al medio extracelular 4-AP (1 mM) en un tiempo relativamente menor que cuando se aplicaron los otros bloqueadores ( $Ba^{2+}$ ,  $Cs^+$  y TEA). En condiciones control se obtuvo una FPP =  $1.89 \pm 0.20$  %, sin embargo esta FPP tiende a disminuir rápidamente después de haber bloqueado las conductancias del  $K^+$ . En el panel B podemos observar los registros extracelulares de este experimento en el que se representa el cambio en la FPP en relación a las amplitudes de las dos respuestas sinápticas evocadas. En el experimento se muestra que antes de cualquier manipulación farmacológica (condiciones control) la amplitud al primer estímulo es menor que la segunda amplitud debido al efecto que produce el calcio residual (Fig. 9B). Después de aplicar el 4-AP (1 mM) se observa que las amplitudes cambian y lo consiguiente el cociente entre la amplitud  $S_2/S_1$  tiende a disminuir por lo que nuestros resultados muestran que el bloqueo de las conductancias de potasio por 4-AP (1 mM) produjo una disminución en la FPP =  $-90.12 \pm 1.75$  % (mediana = 60.52 %;  $n = 5$ ;  $P < 0.01$  U de Mann-Whitney). Cuando ya no se observo cambio en la FPP producida por el efecto de 4-AP se aplico DPDPE (1  $\mu$ M) al medio extracelular. El efecto del DPDPE no se ve bloqueado en presencia de 4-AP ya que se observa un aumento en la FPP =  $97.46 \pm 42.52$  %; (mediana = 52.11 %; NS, U de Mann-Whitney). En el panel B se muestran los potenciales de campo correspondientes a los números en A. El registro superior muestra que en condiciones control la FPP fue superior a 1 y se observa cuando la amplitud al primer estímulo es menor que la amplitud a un segundo estímulo. El registro medio representa la disminución en la FPP producida por el bloqueo de las conductancias de  $K^+$ , y se observa cuando la amplitud al primer estímulo es mayor que la amplitud al segundo estímulo.

El registro inferior muestra el aumento en la FPP después de haber aplicado el DPDPE note que la amplitud al primer estímulo disminuyo en comparación con el trazo medio. Estos resultados nos indican que la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  en las terminal corticoestriatales, no se ve afectada por el bloqueo de las conductancias de  $K^+$  que son sensibles a 4-AP (1 mM).



**Figura 9. Efecto del DPDPE en presencia de 4-Aminopiridina.** Experimentos de oclusión farmacológica, para determinar si el bloqueo de las conductancias de potasio por 4-AP (1 mM) ocluyen el efecto del DPDPE (1 μM) agonista de receptores a opiáceos tipo δ. El efecto del DPDPE (1 μM) sobre la FPP en presencia de 4-AP no se ve ocluido ya que se produjo un aumento en la FPP =  $97.46 \pm 42.52$  % (mediana = 52.11 %; NS, U de Mann-Whitney). Observe el aumento en la amplitud al primer estímulo después de la aplicación del 4-AP, este aumento en la amplitud al primer estímulo tiende a disminuir después de aplicar el DPDPE (1 μM). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de 4-AP y DPDPE durante el experimento. Izquierda: se muestra el curso temporal de un experimento, en el cual se observa que la activación de receptores tipo δ en las terminales corticoestriatales sigue produciendo inhibición presináptica, aun cuando algunas conductancias de potasio habían sido bloqueadas después de aplicar 4-AP (1 mM) al medio extracelular. Derecha: registros de potenciales sinápticos excitatorios correspondientes a los números a la derecha.

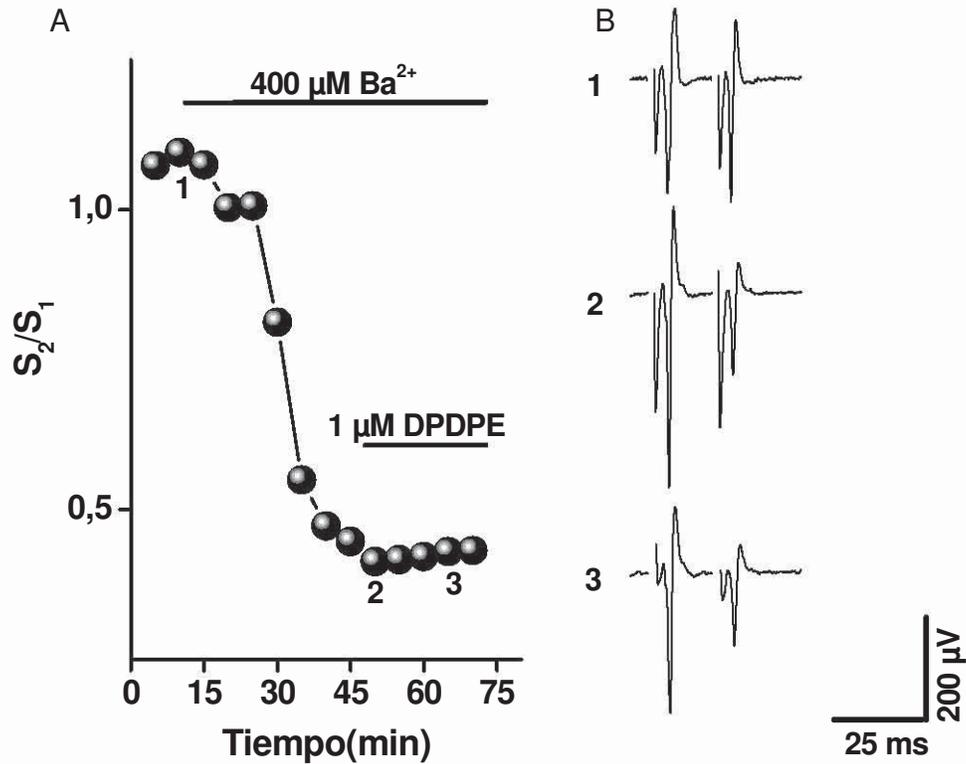
### 3) Efecto del DPDPE en presencia de Bario.

En la figura 10A se muestra primeramente el efecto que tuvo el bloquear las conductancias de potasio después de la aplicación del bario (400 μM), así como el efecto del DPDPE después de haber bloqueado las conductancias de potasio.

En el panel A se muestra el curso temporal de un experimento y en el panel B los registros extracelulares que corresponden a los números en el panel A. El tiempo inicial de registro se tomo como el tiempo control obteniéndose una FPP =  $1.38 \pm 0.13$  % antes de aplicar los fármacos. Los canales de potasio sensibles a la aplicación de  $Ba^{2+}$  (400  $\mu$ M; barra horizontal) produjo un decremento en la FPP, la cual se refleja como el cambio en la relación entre las amplitudes de la segunda respuesta con respecto a la primera (B). Es decir cuando los canales de potasio se bloquearon la amplitud al primer estímulo fue mayor que la amplitud del segundo estímulo. Entonces de manera fisiológica este último efecto significa que se incrementa la probabilidad de liberación del transmisor; en este caso el glutamato de las aferentes corticoestriatales. El promedio de nuestros resultados muestran que el bloqueo de las conductancias de potasio por bario produjo una disminución en la FPP =  $-52.73 \pm 17.75$  %; (mediana = 52.74 %; n = 10; P < 0.001 U de Mann-Whitney) respecto del control; lo cual nos indica que los canales de potasio sensibles al bario también están participando en la liberación del transmisor pues su bloqueo incrementa la probabilidad de liberación. Cuando ya no se observo un cambio en la FPP en el tiempo de aplicación del bario, se aplico al medio extracelular el agonista a opiáceos tipo  $\delta$  DPDPE (1  $\mu$ M). Como se puede apreciar en la figura 10 el efecto del DPDPE fue casi completamente ocluido después de haber bloqueado las conductancias potasio con  $Ba^{2+}$  400  $\mu$ M, ya que solo produjo un pequeño incremento en la FPP =  $9.83 \pm 6.65$  % (mediana = 14.71 %; n = 10; P < 0.01 U de Mann-Whitney). El registro superior muestra que en condiciones control la FPP fue superior a 1 y se observa cuando la amplitud al primer estímulo es menor que la amplitud a un segundo estímulo.

El registro medio representa la disminución en la FPP producida por el bloqueo de los canales de  $K^+$ , este efecto se observa cuando la amplitud al primer estímulo es mayor que la amplitud al segundo estímulo, finalmente en el registro inferior se sigue observando disminución en la FPP después de haber aplicado al medio extracelular el DPDPE. Estos resultados nos indican que la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  en la terminal corticoestriatal se ve afectada por el bloqueo de los canales

de  $K^+$  sensibles al bario indicando que posiblemente el DPDPE actúa sobre dichas conductancias de potasio.

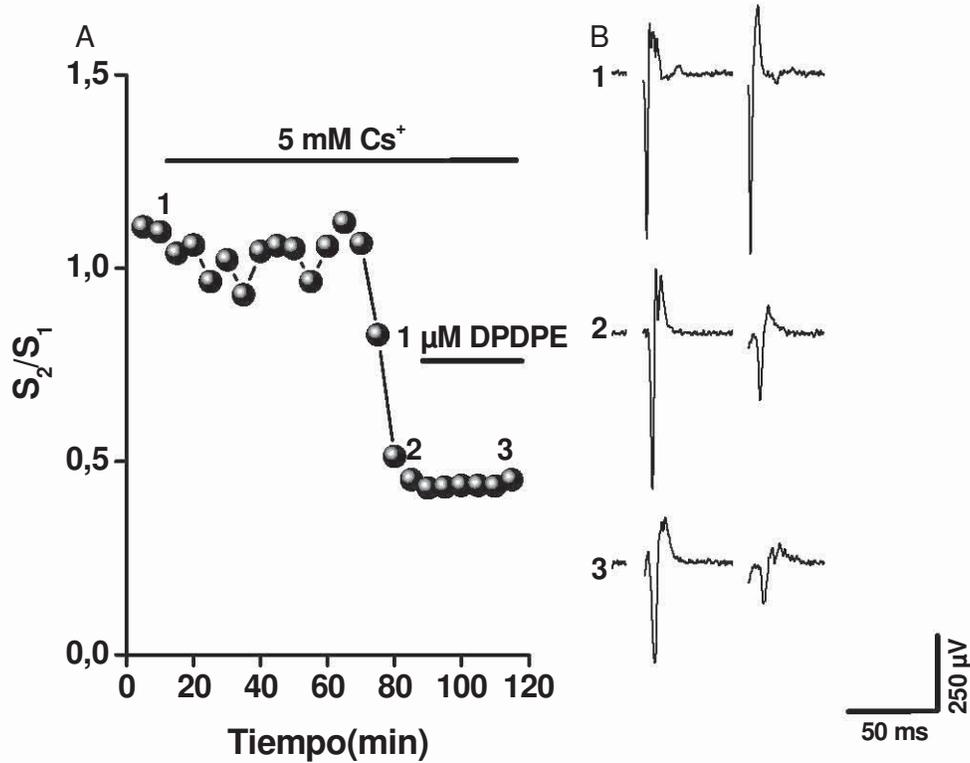


**Figura 10. Efecto del DPDPE en presencia de Bario.** Experimentos de oclusión farmacológica, para determinar si el bloqueo de las conductancias de potasio por bario ocluyen el efecto del DPDPE agonista de receptores a opiáceos tipo  $\delta$ . El efecto del DPDPE (1  $\mu M$ ) sobre la FPP en presencia de bario se ve bloqueado completamente. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de  $Ba^{2+}$  (400  $\mu M$ ) y DPDPE (1  $\mu M$ ). Izquierda: se muestra el curso temporal de un experimento, en el cual se observa que el bloqueo de los canales de  $K^+$  después de haber aplicado el  $Ba^{2+}$  (400  $\mu M$ ) al medio extracelular, produjo una disminución en la FPP, en estas condiciones se observó que la activación de receptores tipo  $\delta$  en las terminales corticoestriatales después de aplicar el DPDPE produjo solamente un pequeño incremento en la facilitación por pulso pareado de  $9.83 \pm 6.65$  % (mediana = 14.71 %;  $n = 10$ ;  $P < 0.01$  U de Mann-Whitney). Derecha: registros de potenciales sinápticos excitatorios correspondientes a los números a la derecha.

#### 4) Efecto del DPDPE en presencia de Cesio.

En la figura 11A se muestra primeramente el efecto que tuvo el bloquear las conductancias de potasio después de la aplicación del Cesio (5 mM), así como el efecto del DPDPE después de haber bloqueado las conductancias de potasio. En el panel A se muestra el curso temporal de un experimento y en el panel B los registros extracelulares que corresponden a los números en el panel A. El tiempo inicial de registro se tomo como el tiempo control obteniéndose una FPP =  $1.24 \pm 0.07$  % antes de aplicar los fármacos. Como se puede apreciar, el tiempo que transcurre desde la aplicación del cesio hasta obtener la depresión por pulso pareado es muy largo en algunas ocasiones de más de tres horas. Esto puede deberse a que el cesio se internaliza al canal de potasio desde el lado citoplasmático de la membrana. Cuando se utilizo el cesio como antagonista de canales de potasio se produjo una disminución en la FPP =  $-62.07 \pm 5.07$  %; (mediana = 56.73 %; n = 9;  $P < 0.0001$  U de Mann-Whitney) respecto al control. Dicho efecto nos sugiere que también hay canales de potasio sensibles al cesio que participan en la liberación del transmisor. Cuando ya no se observo un cambio en la FPP en el tiempo de la aplicación del cesio, se aplico al medio extracelular el DPDPE (1  $\mu$ M). Después de haber bloqueado las conductancias de  $K^+$  con  $Cs^+$  (5 mM), el efecto del DPDPE se vio completamente ocluido durante el tiempo de su aplicación ya que solo produjo un pequeño incremento en la FPP =  $-1.23 \pm 3.34$  % (mediana = 0.72 %; n = 9;  $P < 0.0001$ ; U de Mann-Whitney). El trazo superior muestra que en condiciones control la FPP fue superior a 1 y se observa cuando la amplitud al primer estímulo es menor que la amplitud a un segundo estímulo. El trazo medio muestra la disminución en el FPP cuando las conductancias de potasio permanecen bloqueadas, esto se refleja en el registro cuando la amplitud al primer estímulo es mayor que la amplitud al segundo estímulo. Finalmente el trazo inferior muestra que no hubo un cambio en la FPP cuando se aplico el DPDPE, ya que se sigue observando el efecto del cesio sobre la FPP. Es importante hacer notar que el bloqueo de los canales de potasio provoca que el efecto del DPDPE se vea ocluido de manera total y que por lo

tanto cabe la posibilidad de que el efecto inhibitorio de la activación de receptores tipo delta sea en parte por la activación de ciertas conductancias de potasio que son sensibles al cesio, pues su bloqueo produce inhibición del efecto del DPDPE.



**Figura 11. Efecto del DPDPE en presencia de cesio.** Experimentos de oclusión farmacológica, para determinar si el bloqueo de las conductancias de potasio por cesio ocluye el efecto del DPDPE agonista de receptores a opiáceos tipo  $\delta$ . El efecto del DPDPE (1  $\mu$ M) sobre la FPP en presencia de cesio se ve bloqueado completamente. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de Cs<sup>+</sup> (5 mM) y DPDPE (1  $\mu$ M). Izquierda se muestra el curso temporal de un experimento en el cual se observa que el bloqueo de los canales de K<sup>+</sup> después de haber aplicado el Cs<sup>+</sup> (5 mM) al medio extracelular, produjo disminución en la FPP y que al aplicar el DPDPE solamente se observó una FPP =  $-1.23 \pm 3.34$  % (mediana = 0.72 %; n = 9; P < 0.0001; U de Mann-Whitney. Derecha: registros de potenciales sinápticos excitatorios correspondientes a los números a la derecha.

## Discusión

### **Activación del receptor tipo $\delta$ por el agonista DPDPE.**

El presente trabajo confirma la modulación presináptica por algunos neuromoduladores como los péptidos opiáceos en la sinapsis corticoestriatal, debido a que la activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  aumenta la facilitación por pulso pareado. El aumento en la facilitación por pulso pareado que se observa al aplicar el DPDPE (1  $\mu$ M) fisiológicamente indica una disminución en la liberación del transmisor glutamato en la terminal corticoestriatal, este efecto presináptico de los receptores opiáceos ya había sido mostrado mediante el empleo de técnicas de registro intracelular *in vitro* en el estriado de rata, donde se sugiere que la principal acción de los opiáceos sobre neuronas estriatales es la inhibición presináptica de las entradas sinápticas excitatorias corticoestriatales a través de receptores tipo  $\delta$  (Jiang y North, 1992; Yuan et al, 1992). De igual manera en neuronas neocorticales también se ha observado que la activación de receptores  $\delta$  y  $\mu$  disminuyen la transmisión excitatoria glutamatérgica por inhibición presináptica de la liberación de glutamato (Andreas et al, 2000).

### **Efecto del DPDPE en presencia de los bloqueadores de canales de potasio.**

La inhibición presináptica por el receptor  $\delta$  es mediada posiblemente a través de la activación de algunas conductancias de potasio sensibles a TEA (20 mM), bario (400  $\mu$ M) y cesio (5 mM), pues el bloqueo de estos canales ocluyo casi completamente la acción del DPDPE sobre la facilitación por pulso pareado. Dicho fenómeno se observo en los experimentos de oclusión farmacológica; ya que después de haber bloqueado las conductancias de potasio el efecto del DPDPE se vio disminuido.

Por lo que se vio que en presencia de TEA (20 mM) el DPDPE solamente produjo un  $7.45 \pm 7.63$  % (mediana = 3.8 %; n = 6 P < 0.01 U de Mann-Whitney) de FPP, en presencia de bario (400  $\mu$ M) produjo un  $9.83 \pm 6.65$  % (mediana = 14.71 %; n = 10; P < 0.01 U de Mann-Whitney) de FPP y finalmente en presencia de cesio (5 mM) produjo  $-1.23 \pm 3.34$  % (mediana = 0.72 %; n = 9; P < 0.0001;

U de Mann-Whitney) de FPP en comparación con el  $73.50 \pm 20.63$  % (mediana 46.72 %; n = 15;  $P < 0.0001$  U de Mann-Whitney) de FPP que se produce al aplicar el DPDPE (1  $\mu$ M) antes de bloquear las conductancias de potasio (Fig. 12). Estos resultados nos sugieren entonces que si existe una relación entre la activación de receptores tipo  $\delta$  y las conductancias de potasio para producir modulación presináptica. El incremento en las conductancias de potasio por la activación de receptores a opiáceos fue primeramente reportada por North y colaboradores (1987), ellos observaron que el acoplamiento entre receptores a opiáceos y conductancias de potasio se da a través de las proteínas-G. Las conductancias de potasio que se incrementan son rectificadores entrantes, y se observa una fuerte hiperpolarización de la membrana.

Aunque varios neurotransmisores han mostrado incrementar conductancias de potasio en las células neuronales, el tipo de conductancias afectadas no siempre han sido caracterizadas en detalle sin embargo, las evidencias sugieren que frecuentemente se muestra rectificación entrante (North et al, 1987). Otros estudios electrofisiológicos también han mostrado que la activación de receptores tipo  $\delta$  hiperpolarizan algunas neuronas como resultado de un incremento en las conductancias de potasio, inhibiendo presináptica mente la liberación de aminoácidos excitatorios (Mihara y North, 1986; Shen et al, 1992, 2002; Tanaka y North, 1994; Piguet y North, 1993).

Los opiáceos actúan inhibiendo el disparo de neuronas en muchas regiones del sistema nervioso de mamíferos (Duggan y North, 1984). La inhibición directa del potencial de acción resulta de una hiperpolarización de la membrana; la membrana se hiperpolariza debido a una serie de canales de potasio que se abren (North, 1986). En efecto después de un potencial de acción le sigue una hiperpolarización como resultado de la activación de diferentes canales de potasio.

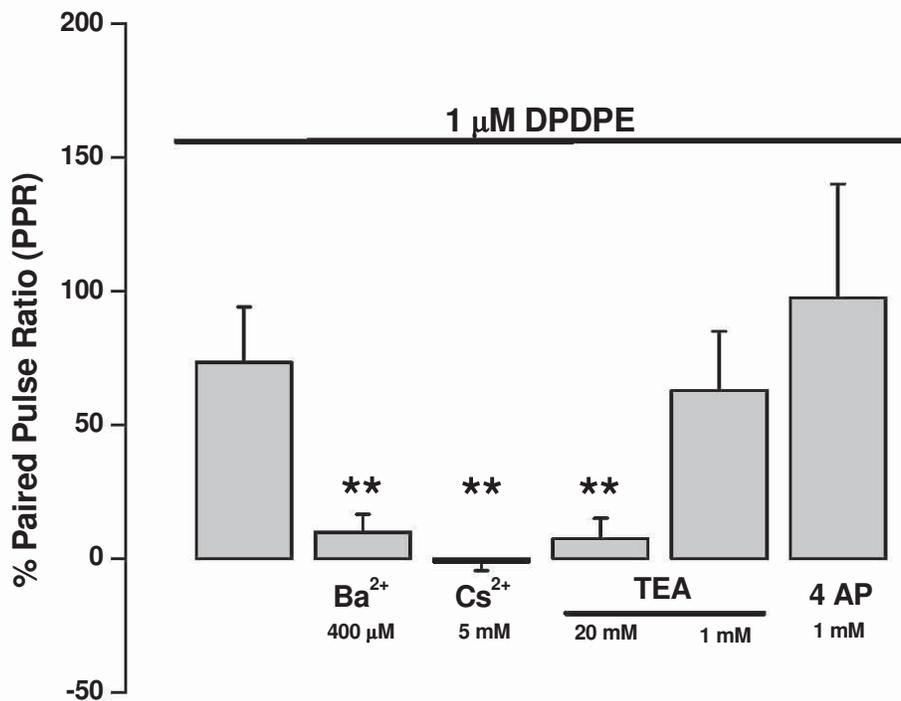


Figura 12. Efecto de DPDPE (1  $\mu$ M) antes y después del bloqueo de los canales de potasio. El efecto del DPDPE sobre la FPP se suprime de manera significativa en presencia de bario, cesio y TEA (20 mM). El efecto del DPDPE sobre la FPP no se ve ocluido en presencia de TEA (1 mM) y 4-AP (1 mM).

La apertura de canales de potasio dependientes de voltaje producen una hiperpolarización rápida, sin embargo se ha visto que en algunas neuronas las corrientes de potasio activadas por calcio ( $K_{Ca}$ ) también contribuyen al postpotencial hiperpolarizante (Sah, 1996).

La función de los  $K_{Ca}$  en relación a la liberación del transmisor no está firmemente establecida (Meir et al, 1999), sin embargo se piensa que los  $K_{Ca}$  pueden regular la duración del potencial de acción que invade la terminal nerviosa, limitando la entrada de calcio. Algunos investigadores reportan un incremento en la liberación del transmisor cuando se aplican, a la terminal nerviosa, bloqueadores selectivos de canales de potasio como caribdotoxina (Robitaille et al, 1993a; Robitaille y Charlton, 1992), mientras que otros muestran que el bloqueo selectivo producen poco efecto sobre la liberación

del transmisor (Molgo y Tabti, 1989). La activación de las conductancias de  $K_{Ca}$  pueden causar hiperpolarización de la membrana, limitando la entrada de calcio, y subsecuentemente reduce la liberación del transmisor ya que se ha observado disminución en la facilitación por pulso pareado en la unión neuromuscular de calamar cuando los canales de  $K_{Ca}$  se bloquean (Sivaramakrishnan et al, 1991). Se ha observado que los canales de potasio sensibles a calcio en especial los canales  $SK_{Ca}$  son activados como resultado de la acción de neurotransmisores (Haylett y Jenkinson, 1990).

### **Modulación presináptica por la activación del receptor $\delta$ en presencia de TEA y 4-AP.**

Aunque se observo que el bloqueo de algunas conductancias de potasio que son sensibles a TEA (20 mM), bario (400  $\mu$ M) y cesio (5 mM) ocluyen el aumento en la FPP producida de manera normal por la aplicación extracelular del DPDPE (1  $\mu$ M), otras conductancias de potasio que son sensibles a TEA (1 mM) y 4-AP (1 mM) no modulan la activación de receptores  $\delta$  ya que su bloqueo no ocluye el efecto del DPDPE sobre la FPP (Fig. 12).

Como se observa en la figura 8 la aplicación del DPDPE (1  $\mu$ M) produjo un aumento en la FPP de  $62.80 \pm 22.18$  % (mediana = 45.2%; n = 5; NS, U de Mann-Whitney) en presencia de TEA (1 mM) y un aumento en la FPP de  $97.46 \pm 42.52$  % (mediana = 52.11 %; NS, U de Mann-Whitney) en presencia de 4-AP (ver figura 9).

Una posible explicación seria que no todas las conductancias de potasio que se encuentran en las terminales corticoestriatales tengan necesariamente que ser activadas por receptores a opiáceos, ya que la activación de los canales de potasio se da por diversos mecanismos. Sin embargo esto no significa que las conductancias de potasio sensibles a TEA (1 mM) y a 4-AP (1 mM) no participen en la modulación presináptica ya que se muestra una disminución en la FPP de  $-90.12 \pm 1.75$  % (mediana = 60.52 %; n = 5; P < 0.01 U de Mann-Whitney) después de aplicar 4-AP al medio extracelular y una

disminución en la FPP de  $-45.97 \pm 9.65$  % (mediana = 48.41%; n = 5;  $P < 0.06$  U de Mann-Whitney) en presencia de TEA (1 mM).

### **Participación de los canales de potasio en la modulación corticoestriatal.**

La participación de los canales de potasio en la modulación presináptica corticoestriatal fue determinada por bloqueadores inespecíficos de los canales de potasio. La aplicación de los bloqueadores al medio extracelular produjo una disminución en la FPP este fenómeno fisiológicamente nos indica un aumento en la probabilidad de liberación cuando los canales están bloqueados y por lo tanto nos sugiere que ellos están involucrados en la modulación de la liberación de neurotransmisores en este caso de aminoácidos excitatorios como el glutamato. Como resultado de las diversas funciones que se llevan a través de la activación de los canales de potasio, estos canales juegan un papel crítico en la regulación de la liberación del transmisor (Gribkoff et al, 2001).

Debido a que los antagonistas de canales de potasio utilizados en el presente trabajo fueron inespecíficos para cada corriente, no es posible identificar específicamente cuales son las conductancias que son moduladas por la activación de receptores tipo  $\delta$ .

Sin embargo será conveniente discutir el efecto de cada uno de los bloqueadores de canales de potasio que fueron utilizados:

### **Canales de potasio sensibles a TEA.**

El clásico bloqueador de canales de potasio es el TEA, es usado ampliamente como una molécula externa o interna para la boca del poro de los canales de potasio dependientes de voltaje, actúa fisiológicamente bloqueando la vía de permeación iónica, previniendo movimiento de iones potasio a través del poro (Heginbotham y MacKinnon, 1992; Crouzy et al, 2001). Los canales de potasio típicamente entran en una o dos categorías con respecto a la sensibilidad por el TEA externo; esos que son altamente sensibles ( $K_i < 1$  mM; Hille, 1967) y esos que son relativamente insensibles ( $K_i > 20$  mM; Armstrong and Binstock, 1965).

Debido a esta diferencia farmacológica que presentan los canales de potasio se puede explicar entonces porque la aplicación de TEA (20 mM) produjo menor disminución en la FPP =  $-32.11 \pm 15.28$  % (mediana = 22.46 %; n = 6; p < 0.05; U de Mann-Whitney) que la que se observó al utilizar TEA (1 mM); FPP =  $-45.97 \pm 9.65$  % (mediana = 48.41%; n= 5; P < 0.06 U de Mann-Whitney).

Se ha observado que el efecto bloqueador de TEA difiere cuando se aplica internamente ó externamente ya que se han sugerido dos sitios de unión (Amstrong y Hille, 1972), su aplicación externa bloquea algunas pero no todas las corrientes de potasio (Stanfield, 1983), su aplicación interna es menos específica y usualmente menos potente. Existen dos tipos de canales de potasio activados por calcio los llamados BK<sub>Ca</sub> y SK<sub>Ca</sub>. Los canales BK<sub>Ca</sub> son selectivamente bloqueados por Iberotoxina, así como por bajas concentraciones de TEA (TEA;  $\leq 1$  mM) y los canales SK<sub>Ca</sub> son insensibles a bajas concentraciones de TEA, pero son potencialmente bloqueados por apamina (Castle et al, 1989; Sah 1996). El TEA es un bloqueador específico de BK<sub>Ca</sub> y SK<sub>Ca</sub> cuando se aplica extracelular e intracelular (Meir et al, 1999), pero los canales BK<sub>Ca</sub> parecen ser más sensibles a la aplicación interna de TEA que los canales SK<sub>Ca</sub> (ver tabla I).

La alta sensibilidad al bloqueador TEA de los BK<sub>Ca</sub> consiste con la presencia de un residuo aromático en la boca del poro (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y MacKinnon, 1992).

Los canales de potasio rectificadores entrantes y retardados también son sensibles al TEA extracelular (Nicoll et al, 1990; Meir, 1999). El bloqueo de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Kv1) tienen alta afinidad por el TEA extracelular.

En estos canales el receptor es formado por un brazaletes de 4 residuos aromáticos localizados en la boca externa del poro, el TEA interactúa simultáneamente con estos residuos produciendo afinidad para bloquear el poro (Heginbotham y MacKinnon, 1992; Crouzy et al, 2001).

Los canales de potasio tipo A transitorios, los cuales son críticos para regular la excitabilidad celular en neuronas de vertebrados e invertebrados (Hille, 2001) generalmente exhiben una baja sensibilidad al TEA externo. Como consecuencia el TEA es usado rutinariamente para separar corrientes de potasio tipo A ( $I_A$ ) de las corrientes sensibles al TEA, tales como las corrientes de potasio rectificadores retardados (Denton y Leiter, 2002). Sin embargo se ha visto que la corriente A es sensible a TEA a concentraciones bajas (1-2 mM, Thorn et al, 1991). Denton y Leiter, 2002 demostraron que la corriente de potasio tipo A es sensible a TEA a concentraciones bajas, concentraciones que también se requieren para bloquear completamente corrientes de potasio rectificadores retardados.

### **Canales de potasio sensibles a 4-Aminopiridina.**

La corriente A puede ser menos sensible al bloqueo por TEA, pero más sensible al bloqueador 4-AP que los rectificadores retardados ( $I_K$ ) (Hille, 2001). Bajas concentraciones de 4-AP bloquean canales de potasio que son también bloqueados por mas bloqueadores selectivos como dendrotoxina (Coetzee et al, 1999).

Los canales de potasio dependientes de voltaje que median el postpotencial hiperpolarizante rápido son sensibles a 4-AP (Faber y Sah, 2000). Las corrientes de potasio que son sensibles a 4-AP se activan durante potenciales de acción y contribuyen al pospotencial hiperpolarizante rápido. Dendrotoxina es un bloqueador selectivo de canales de potasio dependientes de voltaje, actúa solamente en canales que contienen las subunidades  $K_V1.1$ ,  $K_V1.2$ ,  $K_V1.4$  o  $K_V1.6$ . Bajas concentraciones de 4-AP también bloquean canales que contienen estas subunidades (Coetzee et al, 1999).

De todos los bloqueadores utilizados para el bloqueo de las conductancias de potasio el antagonista 4-AP (1 mM) fue el que produjo mayor disminución en la FPP  $-90.12 \pm 1.75$  % (mediana =  $60.52$  %;  $n = 5$ ;  $P < 0.01$  U de Mann-Whitney).

El 4-AP es permeable a la membrana y bloquea igual cuando se aplica en el interior y exterior de la célula sin embargo, su sitio bloqueador es probablemente interno (Yeh et al, 1976; Merves y Pichan, 1977).

### **Canales de potasio sensibles a bario y cesio.**

En general todos los canales de potasio se bloquean extracelularmente por la aplicación de bario y cesio excepto la corriente tipo A (Castle et al, 1989), sin embargo se ha reportado que algunos tipos de canales de potasio son relativamente insensibles al bario y cesio (Edwards and Weston, 1994). En el presente trabajo se pudo observar un bloqueo significativo de los canales de potasio cuando se utilizaron estos antagonistas. La aplicación del  $Ba^{2+}$  (400  $\mu M$ ) produjo una disminución de la FPP =  $-52.73 \pm 17.75 \%$  (mediana = 52.74 %; n = 10;  $P < 0.001$  U de Mann-Whitney) y la aplicación de  $Cs^+$  (5 mM) produjo una disminución en la FPP =  $-62.07 \pm 5.07 \%$  (mediana = 56.73 %; n = 9;  $P < 0.0001$  U de Mann-Whitney).

### **Activación de canales de potasio a través de receptores tipo $\delta$ .**

Muchos de los trabajos en elucidar el mecanismo por el cual las encefalinas inhiben el disparo neuronal se han realizado en el *locus coeruleus* (North, 1993).

Se ha demostrado que la activación de los receptores  $\mu$  incrementa conductancias de potasio en estas células, inhibiendo su disparo por la hiperpolarización de la célula (Williams et al, 1982; North and Williams, 1985; McFadzean, 1988). Ellos muestran que el mismo tipo de corriente de potasio que se incremento también se observa en presencia del agonistas del receptor tipo  $\delta$  en neuronas del plexo submucoso de cobayo; se sugiere que estas conductancias fueron rectificadores entrantes. En el ovocito de *Xenopus*, las proteínas-G activan rectificadores entrantes que son activados por receptores  $\delta$  (Dascal et al, 1993; Ikeda et al, 1995). Las proteínas-G delimitadas a la membrana regulan canales de potasio, los cuales pueden controlar la liberación de neurotransmisores, las diversas clases de canales de potasio exhiben regulación por proteínas-G, sin embargo la evidencia de esta regulación proviene solamente de

estudios de canales de  $K^+$  rectificadores entrantes (Wickman y Clapham, 1995). Entonces es probable que solamente los canales de potasio que pudieran ser activados por los receptores a opiáceos tipo  $\delta$  sean los rectificadores entrantes o anómalos, ya que son los únicos canales de potasio que están acoplados a proteínas-G (Nichols y Lopatin 1997). Siendo que los receptores a opiáceos producen su efecto inhibitorio a través de las proteínas-G (Childers, 1991; Standifer y Pasternak, 1997).

Capogna y colaboradores (1993) mostraron que el efecto inhibitorio por la activación de receptores  $\mu$  no fue afectado por bario y cesio extracelular, iones que bloquean muchos tipos de canales de potasio. Esto ha sugerido que los receptores a opiáceos pueden inhibir la liberación del transmisor actuando sobre un componente de la maquinaria de liberación (Cohen et al, 1992; Capogna et al, 1993). Sin embargo el presente trabajo muestra que la aplicación extracelular de bario y cesio ocuyen significativamente el efecto del DPDPE sobre la facilitación por pulso pareado, lo cual nos indica que los receptores a opiáceos tipo delta producen su efecto inhibitorio a través de la activación de canales de potasio sensibles a bario y cesio (ver figura 12). En el *locus coeruleus* tanto bario como cesio se ha reportado que también suprimen la acción de los opiáceos (Williams et al, 1988).

Aun a pesar de los avances que se han realizado en relación al mecanismo por el cual la activación de receptores opiáceos producen una disminución en la liberación del neurotransmisor, todavía surgen muchas preguntas, como por ejemplo si el incremento en las conductancias de potasio pudiera ciertamente producir una disminución en la excitabilidad, no es claro si este efecto es suficiente para producir una inhibición de la liberación del neurotransmisor (Simmons y Chavkin, 1996). El presente trabajo pudiera aclarar parte de este problema ya que mediante el protocolo utilizado (facilitación por pulso pareado), en registro extracelular se muestra que el bloqueo de canales de potasio en las terminales nerviosas producen un aumento en la liberación del transmisor, lo cual nos llevaría a pensar entonces que su activación controla de alguna manera la liberación del neurotransmisor.

## Conclusiones

- El circuito corticoestriatal esta regulado por una amplia variedad de neurotransmisores, incluyendo a los aminoácidos, monoaminas y péptidos. En particular los péptidos opioides juegan un importante papel en la modulación de la transmisión sináptica corticoestriatal.
- La activación de receptores a opiáceos tipo  $\delta$  participan en la inhibición presináptica de las aferentes corticoestriatales de rata, ya que su activación produjo un aumento en la facilitación por pulso pareado, es decir se disminuye la probabilidad de liberación del transmisor glutamato cuando los receptores a opiáceos se activan.
- Los canales de potasio sensibles a TEA, 4-AP, bario y cesio participan en la inhibición presináptica de las aferentes corticoestriatales de rata, ya que su aplicación extracelular produjo una disminución en la facilitación por pulso pareado, es decir aumenta la probabilidad de liberación del transmisor glutamato cuando los canales de potasio permanecen bloqueados.
- El aumento en la facilitación por pulso pareado que se observa al aplicar al medio extracelular el DPDPE (1  $\mu$ M) agonista de los receptores a opiáceos tipo  $\delta$  se vio ocluido por el bloqueo de canales de potasio sensibles a TEA (20 mM), bario (400  $\mu$ M) y cesio (5 mM).
- Los canales de potasio sensibles a 4-AP (1 mM) y TEA (1 mM) no están acoplados a los receptores a opiáceos tipo  $\delta$  ya que el efecto del DPDPE no se vio ocluido.
- De acuerdo a las propiedades farmacológicas y funcionales de los canales de potasio se sugiere que todos participan en la modulación de la liberación del transmisor sin embargo, no todos están acoplados a los receptores  $\delta$ .
- Probablemente los canales de potasio que son modulados por la activación de receptores  $\delta$  sean los rectificadores entrantes ya que se ha demostrado que están acoplados a proteínas-G.
- Finalmente, dado que se trata de canales de potasio poco sensibles a TEA, y muy sensibles a 4-AP, por lo que es posible que estos canales sean los responsables de la modulación por opiáceos en la sinapsis corticoestriatal.

## Literatura Citada

- 1.- Aidley JD 1998 The Physiology of Excitable Cells. 4 Ed. Cambridge. pp173- 198
- 2.- Albin LR, Young AB and Benny JB 1990 The Functional Anatomy of basal Ganglia disorders. TINS 12:366-365.
- 3.- Amstrong CM and Binstock L 1965 The selective inhibition of delayed potassium channels of giant axons. J.Gen. Physiol. 58: 413-437.
- 4.- Amstrong CM and Hille B 1972 The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. J. Gen. Physiol. 59:388-400.
- 5.- Amstrong CM and Taylor SR 1980 Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. Biophys J. 30:473-488.
- 6.- Andreas M, Ostermeier MD, Schösser D, Schwender MD and Sutor B 2000 Activation of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors causes presynaptic inhibition of Glutamatergic Excitation in neocortical neurons. Anesthesiology 93:1053-1063.
- 7.- Augustine GJ 1990 Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. J Physiol (Lond) 431:343-364.
- 8.- Bargas J, Galarraga E and Aceves J 1998a Los ganglios Basales. Cap.10. Fisiología. Células, órganos y sistemas. Comps: Muñoz-Martínez E. J. y García J. FCE.Mex. Vol. 5. pp257-273.
- 9.- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y and Surmeier DJ 1994 Cellular and molecular characterization of  $Ca^{2+}$  currents in acutely isolated adult rat neostriatal neurons. J. Neurosci. 14:6667-6686.
- 10.- Bargas, J, G.X. Ayala, E. Hernández and E. Galarraga. 1998b  $Ca^{2+}$  -Channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. Brain Res. Bull. 45: 521-524.
- 11.- Barral J, Galarraga E and Bargas J 1999 Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type  $Ca^{2+}$  channels. Brain Res Bull. 49:285-289.
- 12.- Barral J, Mendoza E, Galarraga E and Bargas J 2003 The presynaptic modulation of corticostriatal afferents by m-opioids is mediated by  $K^+$  conductances. Eur J Pharmacol. 462:91-98.
- 13.- Barral J, Toro S, Galarraga E and Bargas J 2000 GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca channels. Neuroscience Letters. 1-4.
- 14.- Barral J 2001 Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatérgicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 15.- Bennet BD and Bolam JP 1994 Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. Neuroscience.62: 707-719.
- 16.- Bertrand S, Nouel D, Morin F, Nagy F, Lacaille JC. 2003. Gabapentin actions on Kir3 currents and N-type  $Ca^{2+}$  channels via GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells. Synapse 50(2):95-109
- 17.- Bielefeldt K and Jackson MB 1993 A calcium-activated potassium channels causes frequency-dependent action-potential failures in a mammalian nerve terminal. J. Neurophysiol. 70:284-298.
- 18.- Bielefeldt K, Rotter JL and Jackson MB 1992 Three potassium channels in rat posterior pituitary nerve terminals. J.Physiol. (London) 458:41-67
- 19.- Birnbaumer L, Campebell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofman F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T and Tsien RW 1994 The naming of voltage-gated calcium channels. Neuron. 13:505-506.
- 20.- Björklund A, Hökfelt T and Kuhar MJ 1990 Neuropeptides in the CNS (handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Pp 9.

- 21.- Brown D y Rothery P 1993 Statistical Methods for comparing biological populations and processes. Model in Biology: mathematics, statistics and computing. The bath press, Avon Great Britain. Pp. 199-235.
- 22.- Calabressi P, Mercuri NB and Bernardi G 1993 Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. Prog Brain Res 99:299-308.
- 23.- Capogna M, Gähwiler BH, and Thompson SM 1993 Mechanism of  $\mu$ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. J. Physiol. 470:539-558.
- 24.- Castle NA, Haylett DG and Jenkinson DH 1989 Toxin in the characterization of potassium channels. Trends Neurosci 12 (2): 59-65.
- 25.- Caterall WA 1999 Interactions of presynaptic  $Ca^{2+}$  channels and snare proteins in neurotransmitter release. Ann NY Acad Sci. 30(868):144-159.
- 26.- Charlton MP, Smith SJ and Zucker RS 1982 Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse. J Physiol. 323:173-193.
- 27.- Charpak S, Dubois-dauphin M, Raggenbass M and Dreifuss JJ 1988 Direct inhibition by opioid peptides of neurones located in the ventromedial nucleus of the guinea pig hypothalamus. Brain Res 450:124-130.
- 28.- Childers SR 1991 Opioid receptor-couple second messenger systems. Life Sci 48:1991-2003.
- 29.- Christie MJ and North RA 1988 Agonists at  $\mu$  opioid,  $M_2$  muscarinic and  $GABA_B$  receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurones.
- 30.- Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz-de-Miera, E., Rudy, B., 1999. Molecular diversity of  $K^+$  channels. Ann. N.Y. Acad. Sci. 868, 233– 285.
- 31.- Cohen GA, Doze VA and Madison DV 1992 Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. Neuron. 9:325-335.
- 32.- Cooper RJ, Bloom EF and Roth HR 1996 The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 7 ed. Oxford University.
- 33.- Crouzy S, Berneche S and Roux B 2001 Extracellular blockade of K channels by TEA: Results from molecular dynamics simulations of the KcsA channel. J. Gen. Physiol. 118: 207-217.
- 34.- Cuello AC 1978 Endogenous opioid peptides in neurons of the human brain. Lancet. 2:291-293.
- 35.- Daniel WW 2002 Estadística no paramétrica y de libre distribución. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. Limusa Wiley. Pp. 658-737.
- 36.- Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, DiMugno I, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA and Davidson N 1993 Atrial G protein-activated  $K^+$  channels: expression cloning and molecular properties. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 90: 10235-10239.
- 37.- Debanne D, Guérineau MC, Gähwiler BH and Thompson SM 1996 Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release J Physiol (Lond) 491:163-176.
- 38.- Denton JS and Leiter JC 2002 Anomalous Effects of External TEA on Permeation and Gating of the A-Type Potassium Current in *H. Aspersa* Neuronal Somata. J. Membrane Biol. 190: 17-28.
- 39.- Dhawan BM, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS and Hamon M 1996 International Union of Pharmacology. XII. Classification of Opioid Receptors. Pharmacological Reviews. 48:567-256.
- 40.- Ding YQ, Kaneko T, Momura S, et al 1996 Immunohistochemical localization of  $\mu$ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. J.Comp.Neurol. 367:375-402.
- 41.- Dreyer F and Penner R 1987 The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. J. Physiol. 386:455-463.

- 42.- Dodson DP y Forsythe DL 2004 Presynaptic K<sup>+</sup> channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci.* 24(4): 210-217.
- 43.- Dowling EJ 1992 *Neurons and Networks: An Introduction to Neuroscience.* Basal Ganglia. The Belknap Press of Harvard University Press. USA. pp 277-278
- 44.- Duggan AW and North RA 1984 Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev* 35:219-281
- 45.- Dunlap K 1998 Mechanisms and physiology implications of receptor-mediated inhibition of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. See Rudomin et al 1998, pp 13-49.
- 46.- Dunwiddie TV and Hass HL 1985 Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol* 369:365-377.
- 47.- Dutar, P and R. Nicoll 1993 GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the hippocampus: Pharmacology and intracellular Mechanisms. En: Dunwiddie, T.V. y D.M. Lovinger. (Eds.) *Presynaptic receptors in the mammalian brain.* Birkhäuser, Boston. pp 14-26.
- 48.- Edwards G and Weston AH 1994 Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. In: *Handbook of experimental pharmacology.* (Vol. 111) (Szekeres and JC Papp. Eds) Springer-Verlag. Berlin. Pp 469-531.
- 49.- Eliot LS, Kandel ER, Siegelbaum SA y Blumenfeld H 1993 Imaging terminals of Aplysia sensory neurons demonstrates role of enhanced Ca<sup>2+</sup> influx in presynaptic facilitation. *Nature.* 361:634-637.
- 50.- Ewald DA, Williams A and Levitan IB 1985 Modulation of single Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-channel activity by protein phosphorylation *Nature.* 6-12;315(6019):503-506.
- 51.- Faber ES and Sah P 2003 Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist.* 9(3):181-94.
- 52.- Faber ESL and Sah P 2000 The effect of a 4-AP sensitive potassium current on neurones of the rat lateral amygdala. *Soc Neurosci Abstr* 26: 897.
- 53.- Foehring, R.C, Mermelstein PG, Song W, Ulrich S and Surmeier J 2000 Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 84: 2225-2236.
- 54.- Gage PW 1992 Activation and modulation of neural K<sup>+</sup> channels by GABA. *Trends Neurosci.* 15(2): 46-51.
- 55.- Gederman LG, Patridge GJ, Lovinger L and Lovinger MD 2003 It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neuroscience.* 26:184-192.
- 56.- Gerfen CR and Wilson CJ 1996 The basal ganglia. In: Swanson, LW, Björklund A, Hökfelt T. (Eds) *Handbook of chemical neuroanatomy. Integrated Systems of the CNS. Part III.* Elsevier, Amsterdam, pp.377-468.
- 57.- Gerfen C 1992 The neostriatal mosaic: multiple levels of well compartmental organization in the basal ganglia, *Annu. Rev. Neuroscience.* 15: 285-320.
- 58.- Golard A, Witkovsky P and Tranchina D 1992 Membrane currents of horizontal cells isolated from turtle retina. *J Neurophysiol.* 68(2):351-61.
- 59.- Graham B and Redman S 1994 A stimulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 71:538-549.
- 60.- Graybiel AM 1990 Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13:244-254.
- 61.- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW and Kimura M 1994 The basal ganglia and adaptative motor control. *Science.* 265:1826-1831.
- 62.- Graybiel AM, Ragsdale CW, Yoneoka ES and Elde RP 1981 An immunohistochemical study of enkephalins and others neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 6:377-397.

- 63.- Gribkoff KV, Starrett EJ and Dworetzky IS 2001 Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium. *Neuroscientist* 7(2):166-177.
- 64.- Hammond C. 2001. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press. San Diego. Pp 142-146; 188-214.
- 65.- Haylett DG and Jenkinson DH 1990 In potassium channels: structure, classification, function and therapeutic potencial (Cook, NS, ed), pp.71-95, John Wiley and Sons.
- 66.- Heginbotham L and MacKinnon R 1992 The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8:483-491.
- 67.- Hernández –Echeagaray E, J. Bargas and E. Galárraga 1996 Cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents to the neostriatum as seen with paired pulse facilitation and 4-AP induced release. *Neurosci. Abs.* 22:410.
- 68.- Hernández-Echeagaray E 1998 La modulación colinérgica de las aferentes glutamatérgicas el estriado. Tesis de Doctorado. UNAM-UACPyP, México.
- 69.- Hernández-Echeagaray, E, E. Galarraga and J. Bargas. 1998 3-alpha-chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacol.* 37:1493-1502.
- 70.- Hille B 1967 The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J.Gen Physiol.* 59:388-400.
- 71.- Hille B 1994 Modulation of ion-channels function by G-protein- coupled receptors. *Trends Neurosci.*17(12):531-536.
- 72.- Hille B 2001 *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer.
- 73.- Hoffman AF and Lupica CR 2001 Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J.Neurophysiol.* 85 (1):72-83.
- 74.- Hökfelt T (Eds) 2000 *Handbook of chemical Neuroanatomy. Integrated systems of the CNS. Part III*. Elsevier, Amsterdam, Pp 371-468.
- 75.- Hökfelt T 1991 Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron.* 7:867-879.
- 76.- Hughes j, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR 1975 Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonist activity. *Nature (London)* 258:577-579.
- 77.- Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, Usui H and Kumanishi T 1995 Functional couplings of the delta-and kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K<sup>+</sup> channels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 208: 302-308.
- 78.- Iles P 1989 Modulation of transmitter and hormone release by múltiple neural opioid receptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 112:139-233.
- 79.- Isaacson JS and Walmsley B 1995 Counting quanta: direct measurements of transmitter release at a central synapse. *Neuron.* 15:875-884.
- 80.- Ishikawa T, Nakamura Y, Saitoh N, Li WB, Iwasaki S and Takahashi T 2003 Distinct roles of Kv1 and Kv3 potassium channels at the calyx of held presynaptic terminal. *J.Neurosci.* 23(32): 10445-10453.
- 81.- Jaffe JM and Martin WR 1990 opioid analgesics and antagonists. In: *The Pharmacological basis of Therapeutics*. (A Gilman, Rall J, Nies A, y Taylor P eds), Ed. 8 Pergamon Press, New York. 485-573.
- 82.- Jan L and Jan Y 1997 Voltage- gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Phtsiol* 505:267-282.
- 83.- Jan LY and Jan YN 1994 Potassium Channels and their evolving gates. *Nature.* 371:119-122.
- 84.- Jiang ZG and North RA 1991 Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro.*J. Physiol.* 443:533-553.

- 85.- Jiang ZG and North RA 1992 Pre- and Postsynaptic Inhibition by Opioids in Rat Striatum. *J Neurosci.* 12 (1):356-361.
- 86.- Johnston D and Wu SM 1995 *Foundations of cellular neurobiology.* MIT Press. Cambridge. Mass. pp 287-391.
- 87.- Kamiya H and Zucker RS 1994 Residual calcio and short-term plasticity. *Nature.* 371:603-606.
- 88.- Kandel ER and Schwartz JH 1982 Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science.* 218: 433-443.
- 89.- Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM 2000 *Principles of Neural Science.* 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill USA. Pp 175-298.
- 90.- Katz B and Miledi R 1969 Tetrodotoxin- resistant electric activity in presynaptic terminals. *J Physiol (Lond)* 203:459-487.
- 91.- Katz B and Miledi R 1968 The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol.* 195:481-492.
- 92.- Katz B and Miledi R 1970 Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol. (London)* 207:789-801.
- 93.- Kemp JM and Powell TPS 1971a The synaptic organization of the caudate nucleus. *Phil Tras R Soc B262:403-412.*
- 94.- Kemp JM and Powell TPS 1971b The site of termination of afferent fibers in the caudate nucleus. *Phil Tras R Soc B262:413-427.*
- 95.- Knaus H-G, Schwarzer C, Koch R, Eberhart A, Kaczorowski GG, Glossman H, Wunder F, Pongs O, Garcia ML and Sperk G 1996 Distribution of high conductance Ca- activated K channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci* 16:955-963.
- 96.- Koob GC, Sandman A, Strand FL, eds: 1990 A decade of neuropeptides: past, present, and future *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 579.
- 97.- Lancaster B, Nicoll RA and Perkel DJ. 1991 Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 11:23-30.
- 98.- Lancey MG, Mercuri NB and North RA 1989 Two cells types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties. *J Neurosci* 9:1233-1241.
- 99.- Latorre R and Miller C 1983 Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol.* 71(1-2):11-30.
- 100.- Levitan IB 1994 Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu. Rev. Physiol.* 56:193-212.
- 101.- Lodish H, Berk A, Zipursky L. S, Matsudaira P, Baltimore D y Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular.* 4<sup>a</sup> ed. Panamericana. Buenos Aires. Pp 935-943.
- 102.- López HS y Brown AM 1992 Neuromodulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:317-322.
- 103.- Lord JA, Walterfield AA, Hughes J and Kosterlitz HW 1977 Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature.* 267:495-499.
- 104.- Lovinger, D.M. and E. Tyler 1996 Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Int. Rev. Neurobiol.* 39:77-111
- 105.- Lovinger DM, Merritt, A and Reyes D 1994 Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neurosci.* 62: 31-40.
- 106.- Lundberg JM 1996 Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacology Review.* 48:113-178.
- 107.- MacKinnon R and Yellen G 1990 Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science.* 250:276-279.
- 108.- Madison DV and Nicoll RA 1988 Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. *J Physiol* 398: 123-130.

- 109.- Malenka, R.C. and J.D. Kocsis 1988 Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neuroscience* 8: 3750-3756.
- 110.- Mansour A, Schafer MKH, Newman SW and Watson SJ 1991 Central distribution of opioid receptors: a cross-species comparison of the multiple opioid systems of the basal ganglia. In *neurobiology of opioids*. Almeida OFX y Shippenberg TS (eds). Pp 169-183.
- 111.- Mansour A, Fox CA, Akil H and Watson JS 1995 Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *TINS*. 18(1): 22-29.
- 112.- Masaya T and Takatsuji K 1998 Atlas of neuroactive substances and their receptors, in the rat. Oxford Universty Press. Pp 3.
- 113.- McGeorge AJ and Faull RLM 1989 The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-537.
- 114.- McManus O 1991 Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J Biomembr* 23:537-360.
- 115.- McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R y Leonard RJ 1995 Functional role of the  $\beta$  subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron*. 14:645-650.
- 116.- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S and Rahamimoff R 1999 Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *J Physiol. Rev.* 79:1019-1088
- 117.- Melmerstein P.G, R.C. Foehring, T. Tkatch, W.J. Song, G. Baranauskas and D.J. Surmeier. 1999 Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with b subunit expression. *J. Neurosci.* 19:7268-7277.
- 118.- Mennerick S and Zorumski CF 1995 Paire-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons. *J Physiol (Lond)* 488:85-101.
- 119.- Merves H and Pichan Y 1977 The effect of internal and external external 4-aminopyridine one the potassium currents in intracellularly perfused squid giant axons. *J. Physiol.* 268:511-532.
- 120.- Mihara S and North RA 1986 Opioid increase potassium conductance in guinea-pig submucous plexus neurones by activating  $\delta$  receptors. *Br. J Pharmacol* 88:315-322.
- 121.- Miller RJ 1998 Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:201-227.
- 122.- Mitz IM, Sabatini BL and Regehr WG 1995 Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 5:675-88.
- 123.- Molgo J and Tabti N 1989 A review on drugs and toxins affecting presynaptic K currents and phasic quantal transmitter release at motor nerve terminals. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 39: 333-342.
- 124.- Mortita K and North RA 1982 Opiate activation of potassium conductance of myenteric neurones: inhibition by calcium ions. *Brain Res* 242:145-150.
- 125.- Nichols CG and Lopatin AN 1997 Inward Rectifier Potassium Channels. *Ann. Rev. Physiol.* 59:171-191.
- 126.- Nicola SM, Surmeier DJ and Malenka RC 2000 Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci.* 23: 185-215.
- 127.- Nicoll RA, Malenka RC and Kauer JA 1990 Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 70(2):513-65.
- 128.- Nisembaum ES and Wilson CJ 1995 Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci.* 15:4449-4463.
- 129.- Nisenbaum ES, Berger TW and Grace AA 1992 Presynaptic modulation by GABA<sub>B</sub> receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons. *J Physiol.* 67(2):477-481.

- 130.- North RA 1986 Opioid receptor types and membrane ion channels. *TINS*. 9:114-117.
- 131.- North RA 1993 Opioid actions on membrane ion channels. *Handbook. Exp. Pharmacol.* 104: 773-797.
- 132.- North RA and Williams JT 1985 On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* 364:265-280.
- 133.- North RA and Williams JT, Surprenant A and Christie MJ 1987  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors both belong to a family of receptors which couple to a potassium conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5487-5491.
- 134.- Penny GR, Afsharpour S, Kitai ST 1986 The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin-, and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for par overlap. *Neuroscience*. 17:1011-1045.
- 135.- Pepper CM and Henderson G 1980 Opiates and opioid peptides hyperpolarize locus coeruleus neurons in vitro. *Science* 209:394-396.
- 136.- Pert CB and Snyder SH 1973 Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* 70(8):2243-2247.
- 137.- Piguet P and North RA 1993 Opioid action at mu and delta receptors in the rat dentate gyrus in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1139-1146.
- 138.- Ponce A, Bueno E, Kentros C, Vegas-Saenz De Miera E, Chow A, Hillman D, Chen S, Zhu L, Wu MB, Wu X, Rudy B and Thornhill B.1996. G-protein- gated inward rectifier  $K^+$  channel protein (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain. *J. Neurosci.* 16:1990-2001.
- 139.- Purves D, Augustine J. G, Fitzpatrick D, Katz C. Lawrence, LaMantia S. A, McNamara O. J and Williams M. S. 2001. *Neuroscience*. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. Pp 99-107.
- 140.- Quock RM, Burkey<sup>1</sup> HT, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell MS, Slate AC, Ehlert JF, Roeske RW and Yamamura IH 1999 The  $\delta$ -opioid Receptor: Molecular Pharmacology, Signal Transduction, and the determination of Drug Efficacy. *Pharmacological Review*.51: 503-532.
- 141.- Reisine T and Brownstein JM 1994 Opioid and cannabinoid receptors. *Neurobiology*.4:406-412
- 142.- Robitaille R and Charlton MP 1992 Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12:297-305.
- 143.- Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ and Charlton MP 1993 Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron*. 11:645-655.
- 144.- Rockhold WR 2002 The chemical basis for neural communication: In. *Fundamental Neuroscience*. Haines ED (ed). 2<sup>a</sup> ed. Churchill Livingstone. Pp 58-67.
- 145.- Rudy B 1988 Diversity and ubiquity of channels. *Neuroscience*. 25(3):729-749.
- 146.- Sah P 1996  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 19:150-154.
- 147.- Sah P and McLachlan EM 1992 Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J. Neurophysiol* 68:1834-1841.
- 148.- Schafer MKH, Day SJ, Watson et al, 1991. Distribution of opioids in brain and peripheral tissues. In: *Neurobiology of Opioids*. Eds. O.F.X. Almeida and TS Shippenberg. Berlin, Springer-Verlag, pp. 53-62.
- 149.- Schultz. W 1998 Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *The American Physiological Society*. 1-27.
- 150.- Shen KZ and Johnson WS 2002 Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioid receptor in rat subthalamic nucleus in vitro. *J Physiol* 541:219-230.
- 151.- Shen KZ and North RA 1992 Surprenant A. Potassium channels opened by noradrenaline and other transmitters in excised membrane patches of guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol*. 445:581-99.

- 152.- Shieh C, Coghlan M, Sullivan PJ and Gopalakrishnan M 2000 Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities.
- 153.- Simmons LM and Chavkin C 1996 Endogenous opioid regulation of hippocampal function. *Int Rev Neurobiol.* 39:145-196.
- 154.- Simon EJ and Hiller 1978 The opiate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol.* 18:371-394.
- 155.- Simon EJ and Miller JM 1994 Opioid peptides and opioid receptors. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.* Ed. GJ Siegel. 5<sup>th</sup> Ed. New York, Raven Press, pp 321-339.
- 156.- Sivaramakrishnan S, Bittner GD y Brodwick MS 1991a Calcium-activated potassium conductance in presynaptic terminals at the crayfish neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* 98:1161-1179.
- 157.- Sivaramakrishnan S, Brodwick MS and Bittner GD 1991b Presynaptic facilitation at the crayfish neuromuscular junction. Role of calcium-activated potassium conductance. *J. Gen. Physiol.* 98: 1181-1196.
- 158.- Smith AD and Bolam JP 1990 The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Trends Neurosci.* 13:259-265.
- 159.- Standifer KM and Pasternak GW 1997 G-protein and opioid receptor-mediated signaling. *Cell Signal* 9:237-248.
- 160.- Stanfield PR 1983 Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 97:1-67.
- 161.- Strand LF 1999 Neuropeptides. Regulators of physiological processes. Massachusetts Institute of Technology. Pp 122-140.
- 162.- Tabti N, Bourret C and Mallart A 1989 Three potassium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch.* 413(4):395-400.
- 163.- Tanaka and North 1994 Opioid actions on rat anterior cingulate cortex neurons in vitro. *J Neurosci.* 14(3):1106-1113.
- 164.- Thorlin T, Eriksson SP, Hansson E and Rönnebock 1997 (D-Pen<sup>2,5</sup>) enkephalin and glutamate regulate the expression of  $\mu$ -opioid receptors in rat cortical astrocytes. *Neuroscience.* 232:67-70.
- 165.- Thorn PJ, Wang XM and Lemos JR 1991 A fast, transient K current in neurohypophysial nerve terminals of the rat. *J. Physiol. (London)* 32:313-326.
- 166.- Venance L and Glowinski J 2003 Heterogeneity of spike frequency adaptation among medium spiny neurones from the rat striatum. *Neurosci* 122:77-92
- 167.- Walmsley B, Álvarez FJ and Fyffe REW 1998 Diversity of Structure and function at mammalian central synapses. *TINS* 21:81-88.
- 168.- Wang H and Pickel MV 2001 Preferential Cytoplasmic Localization of  $\delta$ -opioid receptors in rat striatal patches: comparison with plasmalemma  $\mu$ -opioid receptors. *J Neuroscience.*
- 169.- Werz MA and Macdonald RL 1983 Opioid peptides with differential affinity for  $\mu$  and  $\delta$  receptors decrease sensory neurones calcium-dependent action potentials. *J Pharmacol Exp Ther* 227:394-402
- 170.- Wickens JA 1993 *Theory of the striatum.* Oxford, UK: Pergamon
- 171.- Wickman K and Clapham DE 1995 Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev.* 75(4): 865-885.
- 172.- Williams JT, Egan TM and North RA 1982 Enkephalin opens potassium channels in mammalian central neurones. *Nature (London)* 299:74-76.
- 173.- Williams JT, North RA and Tokimasa T 1988 Inward rectification of resting and opiate-activated potassium currents in rat locus ceruleus neurons. *J Neuroscience.* 8:4299-4306.
- 174.- Williams, S and D. Johnston. 1993 Muscarinic cholinergic inhibition of glutamatergic transmission En: Dunwiddie, T. y D. Lovinger (Eds.). *Presynaptic receptors in the mammalian brain.* Ed. Birkhauser. Boston. pp 27-41.

- 175.- Wilson C. 1998. The Basal Ganglia. In: The synaptic organization of the brain, 4<sup>a</sup> Edition (Shepherd GM, ed), pp 329-375. N.Y.: Oxford University press.
- 176.- Wilson SJ 1995 The contribution of cortical neurons to the firing pattern of striatal spiny neurons: In: Model of information processing in basal ganglia (Houk, Davis, Beiser), Pp29-31.
- 177.- Wu LG and Saggau P 1997 Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. TINS 20 (5):204-212.
- 178.- Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH and Narahashi T 1976 Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. J.Gen.Physiol. 68:519-539.
- 179.- Yeh JL and Nung JY 1994 Potassium channels and their evolving gates. Nature. 371:119-122.
- 180.- Yellen G 1984 Ionic permeation and blockade in Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of bovine chromaffin cells. J Gen Physiol.84(2):157-86.
- 181.- Yoshimura M and North RA 1983 Substantia gelatinosa neurones in vitro hyperpolarized by enkephalin. Nature (london) 305:529-530.
- 182.- Yuan X, Madamba S and Siggins GR 1992 Opioid peptides reduce synaptic transmission in the nucleus accumbens. Neurosci Lett 134:223-228.
- 183.- Zheng T and Wilson CJ 2002 Corticoestriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations J. Neurophysiol 87: 1007- 1017.
- 184.- Zimmerman, H 1993 Synaptic transmission, cellular and molecular basis. Oxford University Press. N.Y. Pp 111-117.
- 185.- Zucker RS 1999 Calcium-and activity-depend synaptic plasticity. Curr. Opin. Neurobiol. 19:305-313.