



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

*Identificación de los canales de potasio
presinápticos en la sinápsis cortico-estriatal de
rata mediante el empleo de bloqueadores
específicos.*

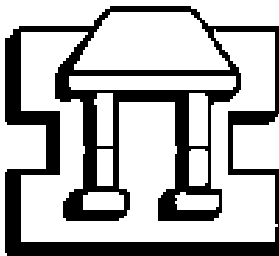
TESIS

Que para obtener el Título de
BIÓLOGO

Presenta

Francisco Miguel Torres Cruz

ASESOR: Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México.
Marzo, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero (IN200703; IN204407). Además se contó con una beca **PRONABES**. Este trabajo se realizó durante el periodo Agosto 2005 a Febrero de 2007.

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 (UIICSE)** de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo Diciembre de 2005 a Diciembre de 2006.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

Proyecto Neurociencias, UIICSE. FES Iztacala, UNAM.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Gracias DIOS:

Por permitirme vivir la alegría de terminar con esta etapa de mi vida, dándome la fortaleza basada en el desvelo, cansancio y temperamento de mis padres. No tengo como pagarte por asignarme a esos dos ángeles que me guían; porque sin ellos no soy, ni sería lo que ahora soy. Lo único que te puedo prometer es que siempre los amaré más allá de mi existencia.

A mi Padre Juan Torres Mancilla

Porque desde pequeño ha sido para mí un hombre grande y maravilloso y que siempre he admirado.

Gracias por guiar mi vida con energía, esto es lo que ha hecho de mí lo que soy: un profesional. Gracias por todo.

A mi Madre Rosa María Cruz Flores

Con la mayor gratitud por todos sus esfuerzos, sus desvelos, sus sacrificios para que yo pudiera terminar mi carrera profesional.

Gracias por guiar mi camino y estar siempre junto a mí en los momentos difíciles.

Agradezco infinitamente a Dios por tenerlos a ustedes, llenando de dicha y amor cada día de mi vida. Para quienes la principal satisfacción ha sido verme convertido en un profesional y a quienes nunca podré defraudar.

A mis hermanos: Alma Rosa, Juan Miguel (†), Juanita y Juan Fernando

Por sus consejos, siendo los tres un ejemplo para mí.

Que me brindaron su apoyo incondicional y que en las diferentes etapas de mi vida académica me alentaron a seguir adelante para enfrentar a la vida.

A mis sobrinos: Juan Luis y Melanie Joceline

A quienes quiero mucho y espero darles un buen ejemplo.

A mi Maestro Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

Aprender es querer avanzar siempre un poco más...

Podemos hacerlo solos, pero la mayoría de las veces necesitamos de una guía, de alguien que nos enseñe a descubrir y a valorar los secretos de la sabiduría que encierra el camino; y USTED lo hizo excelente. ¡Gracias! Fue un placer haber sido su discípulo.

A mis sinodales: Dra. Bertha Segura Alegría, Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz, M. en C. Javier Alonso Trujillo y Biol. Hugo Jesús Castro Cortés y cada uno de los profesores de la Carrera de Biología por sus consejos y paciencia.

A mis amigos Enrique, Raúl y Guillermo.

Y a todos mis demás compañeros y amigos de la Carrera, que son los hermanos que puede elegir en esta vida y que compartieron mis alegrías y tristezas; mis éxitos y fracasos, por todos los detalles que me han brindado durante mi vida como estudiante y compañero. Asimismo, a mis compañeros y compañeras del Laboratorio y de brigada del Servicio Social.

Mi más profundo agradecimiento.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios profesionales y los conocimientos necesarios para enfrentarme al mundo. ¡Gracias!



Carrera de Biología

*¡Gooya!, ¡Gooya! cachún, cachún ra ra,
Cachún, cachún ra ra ¡Gooya!... ¡UNIVERSIDAD!*

*“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2007.*

INDICE

RESUMEN	6
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	7
La Transmisión sináptica.	7
La Sinápsis eléctrica.	7
La Sinápsis química.	7
La modulación sináptica.	8
Canales iónicos.	10
Canales de potasio.	11
Estructura de los canales de potasio.	11
Principales clases de canales de potasio.	12
Propiedades funcionales de los tipos de Canales de Potasio.	13
Farmacología de los canales de potasio.	14
Los Ganglios Basales (GB).	16
El neocórtex.	17
Elementos neuronales en el neocórtex.	18
Interneuronas.	18
<hr/>	
JUSTIFICACIÓN	20
<hr/>	
OBJETIVOS	21
GENERAL	21
PARTICULARES	21
<hr/>	
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Organismos.	21
Estimulación y Registro de potenciales de campo.	22
Procesamiento de datos.	22
Protocolo Experimental.	23
Fármacos Utilizados.	25
Análisis de Datos.	26
<hr/>	
RESULTADOS	27
Protocolo por pulso pareado.	27
Efecto con bloqueadores no específicos.	28
Efecto de las Dendrotoxinas (DTX's).	30
Efecto de la Tityustoxina K α .	31
Efecto de la Agitoxina y Margatoxina.	32
Efecto de la Iberiotoxina y Apamina.	33
Efecto de la BDS I y II.	34
Efecto de la Tertiapina.	35
<hr/>	
DISCUSIÓN	37
Bloqueo con Dendrotoxinas.	38
Bloqueo con Tityustoxina K α .	39
Bloqueo con Agitoxina y Margatoxina.	39
Bloqueo con Iberiotoxina y Apamina.	40
Bloqueo con BDS I y II.	41
Bloqueo con Tertiapina.	42
Participación de los canales de potasio en la modulación cortico-estriatal.	43
<hr/>	
CONCLUSIONES	46
<hr/>	
LITERATURA CITADA	47

RESUMEN

El protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP) y los registros extracelulares de potenciales de campo, fueron usados para identificar los tipos de canales de potasio presinápticos que se encuentran en las terminales nerviosas de la sinápsis cortico-estriatal de la rata mediante experimentos de oclusión farmacológica. Estos canales iónicos participan en un gran número de funciones celulares y son puntos críticos para la regulación de la neurotransmisión en el sistema nervioso.

Alteraciones en los canales de potasio pueden generar perturbaciones en la excitabilidad de la membrana así como en la función neuronal. Asimismo, son blancos de transmisores, hormonas y de algunos fármacos que pueden modificar su función. Las técnicas anteriores fueron usadas para medir los efectos de bloqueadores específicos de canales de potasio los cuales fueron: BDS I y II, Margatoxina, Tertiapina, Tityustoxina $K\alpha$, Iberiotoxina, Apamina, Agitoxina y Dendrotoxinas (α , β , γ , δ , I y K). Los experimentos se realizaron en presencia de Bicuculina 10 μ M que es un bloqueador específico del receptor $GABA_A$, para eliminar el componente inhibitorio y obtener sólo la respuesta glutamatérgica.

En estas condiciones, la intensidad de los estímulos se ajustaron para ver poca o ninguna facilitación en el tiempo de registro durante el control, lo cual permitió detectar los cambios provocados por la administración de los diferentes bloqueadores en esta sinápsis, asimismo determinar el cambio en la facilitación, que es el cociente entre la amplitud de la respuesta al segundo estímulo (S_2) entre la respuesta al primer estímulo (S_1). Los bloqueadores se prepararon en soluciones stock, se disolvieron en la solución salina y se administraron a la preparación a través del dispositivo de perfusión.

El bloqueo de canales de potasio mediante el empleo de bloqueadores específicos, produjo en la mayor parte de los casos depresión por pulso pareado (DPP), lo que sugiere que dichos canales están presentes en las terminal sinápticas cortico-estriatales. Los principales canales presentes pertenecen a la familia $Kv1$, excepto el $Kv1.2$ ya que no se observó ningún efecto significativo después de la aplicación del bloqueador específico: Tityustoxina $K\alpha$. Los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} tipo BK estuvieron presentes, por el contrario otros canales de potasio dependientes de Ca^{2+} como los SK no se presentaron en el estriado, pero ejercen su efecto en otras neuronas ya que en términos generales la Apamina mostró un aumento en la FPP lo que sugiere que el papel de estos canales pudiera ser indirecto.

Los resultados mostrados en el presente trabajo sugieren que los canales de estas familias intervienen en los procesos de modulación de la liberación de neurotransmisores.

INTRODUCCIÓN

La Transmisión sináptica.

La transmisión sináptica es la principal vía de comunicación en el sistema nervioso, es el mecanismo que se establece entre dos neuronas y a través del cual se transmiten las señales eléctricas de unas células nerviosas a otras (Engelman y MacDermott, 2004). El punto en que se transmite la actividad se llama sinápsis (Matthews, 2001) y existen dos clases de sinápsis de acuerdo al tipo de transmisión: las sinápsis eléctricas y la sinápsis químicas.

La Sinápsis eléctrica.

En las sinápsis eléctricas la transmisión de los impulsos eléctricos se lleva a cabo directamente, desde la célula presináptica a la célula postsináptica, mediante el cambio en el potencial de membrana y es conducida a otra célula por una vía de baja resistencia denominada unión estrecha o comunicante, formada por conexinas y se trata de un tipo de comunicación rápida y de forma bidireccional (Simon y Goudenough, 1998; Kandel *et. al.*, 2000).

La Sinápsis química.

En este tipo de sinápsis, las membranas plasmáticas de ambas células están separadas por una hendidura sináptica. Por lo tanto, utilizan una sustancia transmisora con que la neurona presináptica se comunica con la postsináptica (Fig. 1). Es necesaria la liberación de un transmisor químico por parte de la célula presináptica para que se produzca la transmisión de los impulsos eléctricos. Este tipo de transmisión es más lenta, lo que permite que se adapte a una variedad de funciones y que su actividad sea diversa.

Como se mencionó, esta sinápsis utiliza una sustancia transmisora para que la neurona presináptica se comunique con la postsináptica, la cual es sintetizada por la neurona presináptica, almacenada en vesículas y liberada al espacio extracelular (Kandel *et. al.*, 2000).

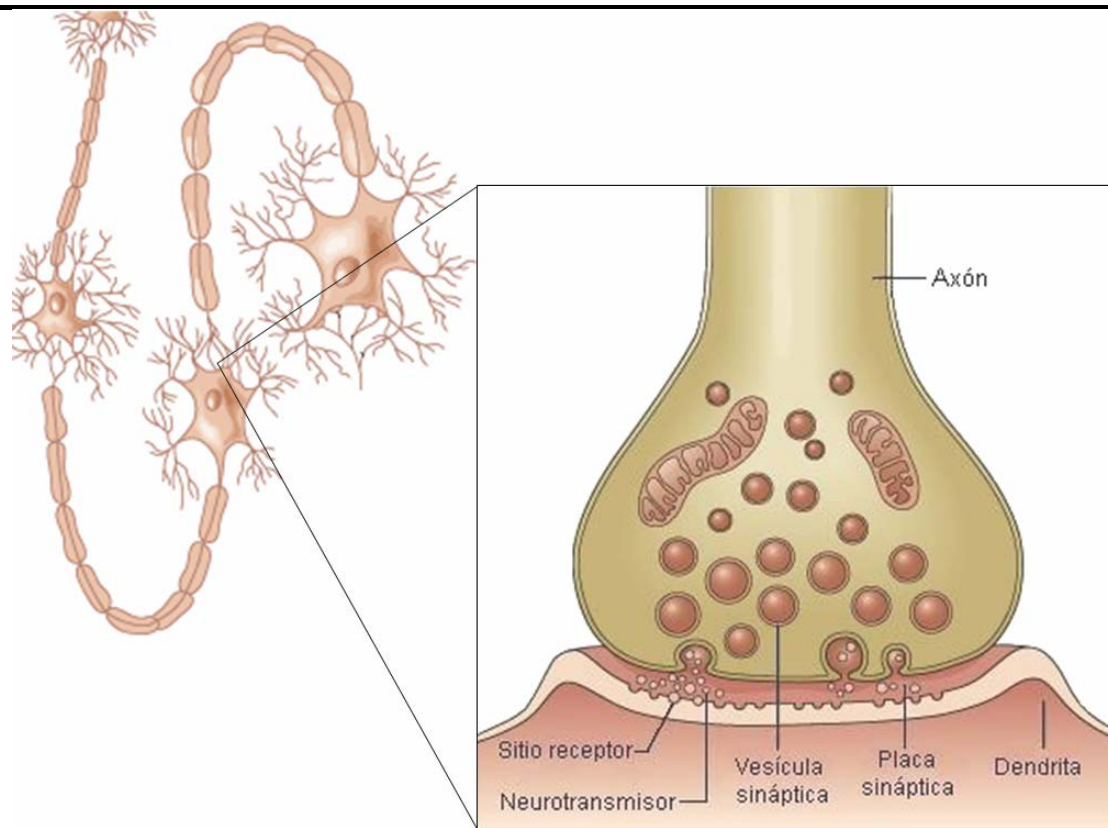


Figura 1. Esquematación de una sinápsis química. Se puede apreciar los elementos pre y postsinápticos, así como un agente químico (neurotransmisor).

La modulación sináptica.

La terminal sináptica es un sitio de regulación de los cambios dependientes de la actividad en la función sináptica. La liberación del neurotransmisor de las terminales presinápticas es modulada por una variedad de mecanismos o factores, por ejemplo la acción de diversos canales iónicos (Fig. 2) y dicha modulación es importante para numerosas funciones nerviosas (Miller, 1998; Barral, 2001).

En general, para las sinápsis químicas existen dos tipos de receptores: los que se constituyen como receptor-canal llamados receptores ionotrópicos o canales iónicos dependientes de neurotransmisor, que son proteínas transmembranales los cuales contienen un canal selectivo para diferentes estirpes iónicas. Este tipo de receptores responden muy rápidamente a la activación

producida por los diferentes neurotransmisores (Bertrand y Changeux, 1995). Otro tipo de receptores son los metabotrópicos, en ellos el receptor es una estructura independiente del efector, que típicamente es un canal iónico, en este caso la respuesta es más lenta y actúa de manera indirecta, ya que el acople entre efectores y receptores está mediado por proteínas-G heterotrimericas y a mecanismos de señalización por segundos mensajeros (Bertrand y Changeux, 1995; Hammond, 2001; Hille, 2001).

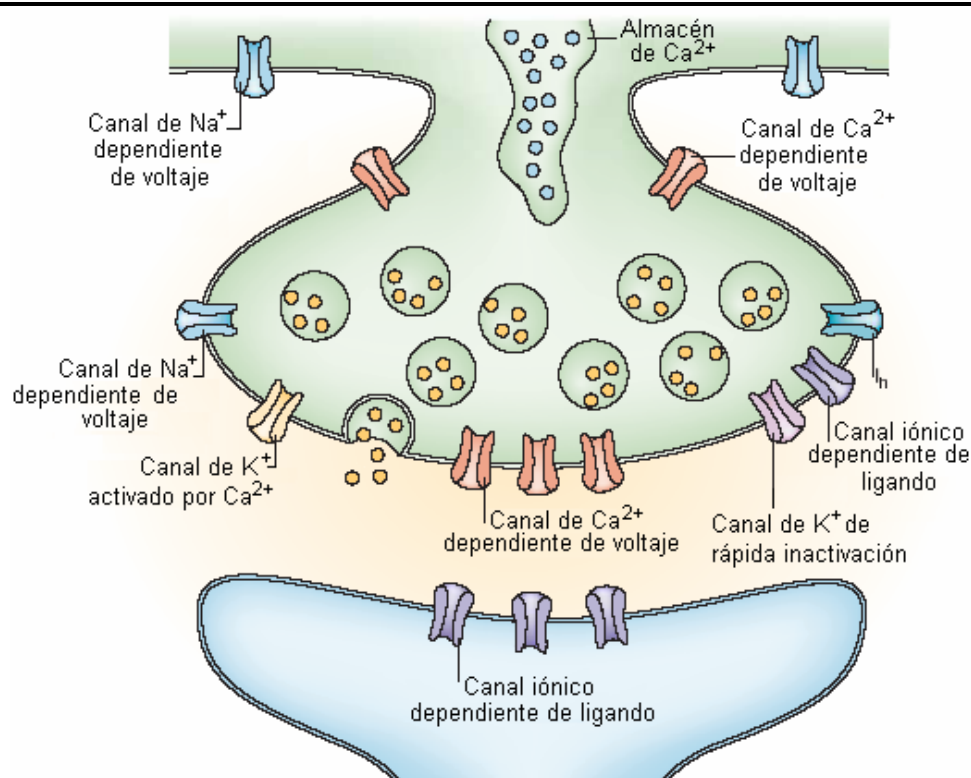


Figura 2. Factores presinápticos que influyen en la modulación de la liberación del neurotransmisor. Varios canales pueden ser expresados cerca de los sitios de liberación del transmisor, incluidos los que realzan la liberación como los canales de Sodio y Calcio dependientes de voltaje; y los que suprimen la liberación como los diferentes tipos de canales de potasio. Los almacenes de calcio en la terminal también contribuyen a la regulación de la liberación del neurotransmisor. La activación de canales iónicos dependientes de ligandos o de receptores ionotrópicos presinápticos, puede modular estos elementos celulares y de ese modo influir en la liberación. (Modificado de Engelman y MacDermott, 2004).

En el caso de receptores ionotrópicos para el glutamato por ejemplo, son complejos macromoleculares que contienen cuatro dominios transmembranales denominados M1, M2, M3 y

M4, siendo el dominio M2 el que confiere las distintas selectividades iónicas del canal (Bigge, 1999). En los receptores metabotrópicos hay una gran familia que funcionan por la activación del trifosfato de guanina (GTP) heterotrimérico unido a proteínas que juegan papeles importantes en la transducción de señales. Estas moléculas tienen una estructura común formada por 7 dominios transmembranales (7 DTM). La familia GluR3 de receptores metabotrópicos son únicos debido a que tienen una gran región extracelular (Kubo y Tateyama, 2005).

La modulación de los canales ionotrópicos y metabotrópicos pueden 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; Miller, 1998). Esta alteración en los canales se denomina modulación ya que este proceso permite que la célula esté controlada por diversas señales tanto internas como externas. En las neuronas los responsables de la modulación son los neurotransmisores, ya que actúan sobre un receptor que manda señales a la membrana para iniciar una amplia cascada de eventos intracelulares y pueden disminuir la liberación del neurotransmisor y por lo tanto servir como un mecanismo de ajuste a la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación de neurotransmisores (López y Brown, 1992; Miller, 1998).

Como se mencionó con anterioridad, la modulación en la liberación del neurotransmisor es controlando la cantidad de calcio que entra a la terminal presináptica lo cual provoca un incremento en la permeabilidad al Ca^{2+} y promueve la liberación por exocitosis del neurotransmisor contenido en las vesículas; actuando sobre diferentes estructuras de la liberación. Por otro lado, elementos moleculares y celulares (Fig. 2) que forman parte de la terminal son cruciales en determinar la naturaleza de la modulación (Engelman y MacDermott, 2004).

Canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas integrales que atraviesan la membrana celular y que algunos poseen grupos de carbohidratos unidos a su superficie. Todos los canales están compuestos por dos o más subunidades, que pueden ser idénticas o distintas (Kandel *et. al.*, 2000). Los canales

permiten el flujo pasivo de los iones a favor de su gradiente de concentración, entre el exterior e interior de la célula a través de un pequeño agujero lleno de agua en la membrana *-un poro-* (Choe, 2002), además afectan el reconocimiento y selección de los iones que abren y cierran debido a estímulos eléctricos, mecánicos o químicos (Kandel *et. al.*, 2000); y generan y transducen señales eléctricas en las células vivas a través de las membranas. Sus papeles fisiológicos son diversos como es el caso de las neuronas en que el flujo de iones a través de canales de una célula a la siguiente, permite la generación y propagación de los impulsos eléctricos y la transmisión sináptica.

En estudios recientes, muchos canales iónicos se han encontrado involucrados en muchas enfermedades genéticas como la fibrosis cística, arritmia cardíaca y la ataxia. Muchos de los defectos adquiridos o genéticos llamados canalopatías neurológicas que han sido asociadas a la disfunción de los canales de potasio (Benatar, 2000). Algunos canales iónicos se han estudiado mediante alteraciones con moléculas o sustancias que actúan sobre ellos ya sea en su estructura o en su actividad, lo que ocasiona modificaciones en la transmisión del estímulo nervioso.

Canales de potasio.

Algunos de los canales que están en las terminales nerviosas son los canales de potasio, éstos son la clase más diversa de canales iónico (Benatar, 2000), son un importante determinante de actividades celulares (Pongs, 1999), responsables de la restauración del potencial de reposo en las terminales nerviosas y en consecuencia de la repolarización de sus membranas durante los potenciales de acción (Meir *et. al.*, 1999; Hille, 2001) así mismo la modulación de estos canales pueden influir dramáticamente en la liberación del neurotransmisor (Dodson y Forsythe, 2004).

Estructura de los canales de potasio.

Existen múltiples tipos de canales de potasio que se diferencian en su estructura (Fig. 3), mecanismos de activación, mecanismos de regulación y farmacología. Los canales de potasio son

de interés para los fisiólogos porque son los reguladores de diversas funciones celulares, ya que dichas funciones son moduladas vía activación o inhibición de estos canales.

Los canales de potasio forman tetrámeros de cuatro subunidades α cada una con seis segmentos transmembranales, formadoras del poro y cuatro subunidades β accesorias citoplasmáticas (Pongs, 1999; Benatar, 2000).

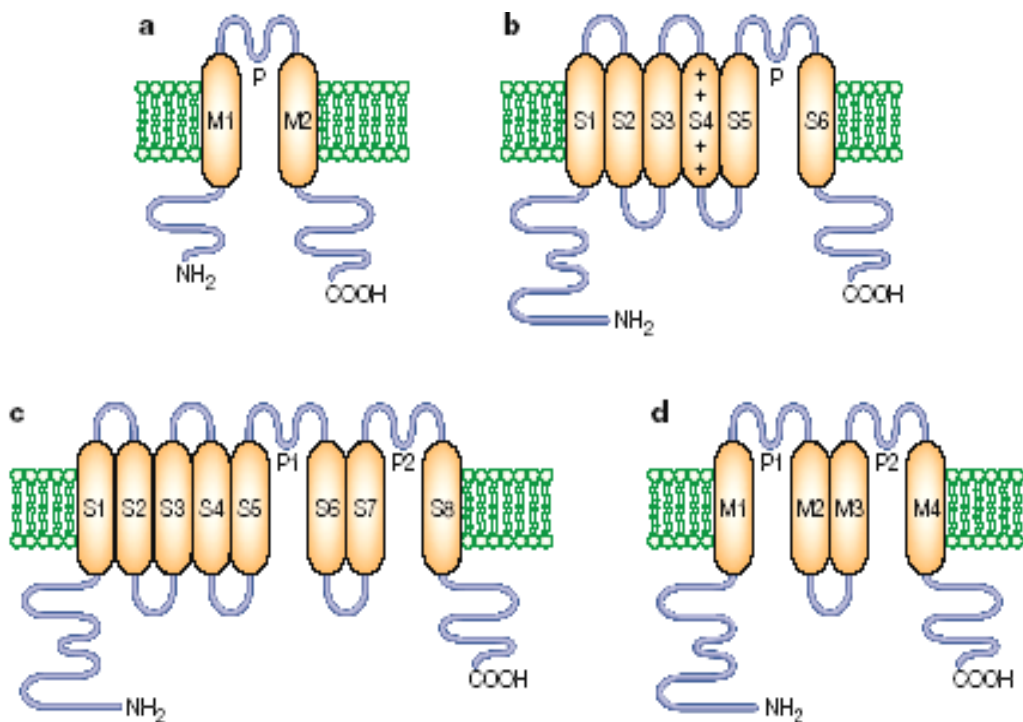


Figura 3. Estructura de los Canales de Potasio. a) Canales 2TM/P, b) Canales 6TM/P, c) Canales 8 TM/2P y d) Canales 4TM/2P (Tomado de Choe, 2002).

Principales clases de canales de potasio.

Con base en el número de segmentos en la membrana, los canales de potasio se han clasificado en:

Canales 2TM/P. Consisten de dos hélices transmembranales (TM) con una asa formadora del poro (P) entre ellos, ejemplificado por canales de potasio rectificadores entrantes y canales de potasio bacterianos como KcsA (Fig. 3a; Choe, 2002).

Canales 6TM/P. Son la clase predominante entre los canales de potasio dependientes de ligando y dependientes de voltaje (Fig. 3b; Choe, 2002).

Canales 8 TM/2P. Son un híbrido de 6 TM/P y 2 TM/P; se encontró primero en la levadura (Fig. 3c; Choe, 2002).

Canales 4TM/2P. Consisten de dos repeticiones de canales 2TM/P, 8TM/2P y 4TM/2P probablemente agrupan como dímeros para formar un canal. Los canales 4TM/2P son más comunes. Estos son llamados canales de “salida”, son blancos de numerosos anestésicos (Fig. 3d).

El segmento S4 es marcado con signos positivos (+) para indicar que actúa como sensor de voltaje en los canales de potasio dependientes de voltaje (Fig. 3b; Benatar, 2000; Choe, 2002).

Propiedades funcionales de los tipos de Canales de Potasio.

Entre las funciones principales que realizan los canales de potasio encontramos:

- 1) **Rectificador retardado.** Comunes en muchas células excitables con cortos potenciales de acción (1-10 ms). Activados en la despolarización y exhiben poco o ninguna activación dentro de cientos o miles de segundos (Meir *et. al.*, 1999). A través de ésta se generan corrientes que contribuyen principalmente para la repolarización del potencial de acción (Hille, 2001; Dodson y Forsythe, 2004).
- 2) **Transitorios rápidos A.** Son activados en la despolarización, especialmente después de periodos de hiperpolarización y se activan rápidamente, usualmente dentro de 1-100 ms (Meir *et. al.*, 1999). Después de la despolarización rápidamente sufren inactivación dependiente de voltaje (Hille, 2001; Dodson y Forsythe, 2004).
- 3) **Canales de activación lenta.** Se activan en despolarizaciones modestas de potenciales de reposo de la membrana (Dodson y Forsythe, 2004), son llamados K_S . cuya activación dura

varios segundos, son menos selectivos que otros canales de potasio dependientes de voltaje (Meir *et. al.*, 1999; Hille, 2001).

- 4) **Canales dependientes de Ca (K_{Ca}).** Se activan solo por las concentraciones micromolares internas de calcio o por el calcio interno y la despolarización. Se subdividen en canales de conductancia pequeña activada por calcio (SK) y conductancia grande (BK) (Meir *et. al.*, 1999; Hille, 2001). Son estructuralmente similar a los K_v , pero tiene un extensión larga del C terminal que se presume para la función en sensación a los niveles de calcio o para modulación por otras moléculas pequeñas (Benatar, 2000)

- 5) **Canales dependientes de ATP (K_{ATP}).** Son insensibles al voltaje, normalmente se encuentran cerrados y son activados por el decremento en el nivel de ATP intracelular (Meir *et. al.*, 1999; Hille, 2001). Estos canales están ampliamente distribuidos en diversos tejidos como células β pancreáticas, músculo esquelético, músculo liso, neuronas y células epiteliales (Benatar, 2000).

- 6) **Canales S.** Solo débilmente sensibles al voltaje, cerrados por la transmisión de serotonina (5-HT), comúnmente encontrados en neuronas sensoriales de moluscos (*Aplysia sp*) así como en sus terminales nerviosas (Meir *et. al.*, 1999; Hille, 2001).

Farmacología de los canales de potasio.

Los canales de potasio pueden ser afectados por diferentes sustancias y se pueden clasificar en dos categorías: agentes que inhiben o bloquean los canales de potasio y agentes que incrementan su actividad. Cada molécula bloqueadora presumiblemente compite con los iones potasio por los sitios de unión dentro del poro del canal o unirse a los sitios cerca del poro (Luzhkov y Åqvist, 2005). Los canales de potasio pueden ser bloqueados tanto externa como internamente.

El Tetraetilamonio (TEA) y el Cesio (Cs^+), son los agentes farmacológicos más comúnmente usados. El TEA y Cs^+ bloquean muchos canales de potasio, por lo menos parcialmente. El bloqueo de canales de potasio por TEA extracelular depende de la presencia de un residuo aromático localizado cerca de la poro del canal (Hille, 2001), mientras que el catión divalente Bario (Ba^{2+}) bloquea la corriente del poro (Luzhkov y Åqvist, 2005). Sin embargo ciertos agentes, particularmente toxinas, parecen ser relativamente selectivas en sus acciones. La principal fuente de obtención de bloqueadores de canales de potasio son venenos de abejas, escorpiones y serpientes; se trata de familias de toxinas última generación que son usadas en el estudio de la farmacología molecular de estos canales (Grishin *et. al.*, 1996; Coetzee *et. al.*, 1999) y para su modulación (Kato *et. al.*, 2000). En la tabla 1 se muestran algunos de estos bloqueadores de los canales de potasio.

TABLA I

Canal de K^+	Actúa extracelular	Actúa intracelular
Rectificador retardado	TEA, Cs^+ , Ba^{2+} , H^+ , Capsaicina, dendrotoxinas, noxiustoxina 4-AP.	TEA y QA, Cs^+ , Na^+ , Li^+ , Ba^{2+} 4-AP
Tipo A	TEA, dendrotoxinas	TEA, 4-AP
K_{Ca}	TEA (BK), Cs^+ , Apamina (SK), clotrimazol (IK/SK), charybdotoxina, Iberiotoxina(BK)	TEA, Na^+ , Ba^{2+}
Rectificadores entrantes	TEA, Cs^+ , Rb^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Sr^+	H^+ , Mg^+ , espermina, espermidina
K_{ATP}	TEA, Cs^+ , Ba^{2+}	TEA, Na^+ , Mg^{2+}
Rectificadores retardados: Componente rápido Componente lento	TEA, Ba^{2+} , Cs^+ 4-AP Dendrotoxina.	TEA
Rectificadores entrantes o anómalos	Sensible a Cs^+ y Ba^{2+} Menos sensible a TEA	Sensible a TEA y menos sensible a Cs^+

Agentes bloqueadores de los canales de potasio. Abreviaturas: TEA, tetraetilamonio; Cs^+ , cesio; Ba^{2+} , bario; 4-AP, 4-aminopiridina (Rudy, 1988; Castle *et. al.* 1989; Nicoll, *et. al.* 1990; Coetzee *et. al.*, 1999; Meir *et. al.*, 1999; Ashcroft, 2000; Hille, 2001; José, 2005; Rodríguez, 2005).

Los canales de potasio establecen el potencial de membrana en el reposo en valores cercanos al potencial de equilibrio para el K^+ y median el transporte del mismo a través de la membrana (Jones, 1997; Reiman y Ashcroft, 1999) y por consiguiente están involucrados y son importantes en la transmisión sináptica.

Como se mencionó anteriormente la modulación en la liberación del neurotransmisor es de gran importancia y debido a esto, un modelo adecuado para estudiar la modulación presináptica por diversas sustancias o agentes químicos es la preparación cortico-estriatal de la rata *in vitro* (Jiang y North, 1991; Barral *et. al.*, 2001). Esta sinápsis es una estructura que forma parte de los ganglios basales que juegan un papel complejo e integral en el control del movimiento de los que a continuación se hablará brevemente.

Los Ganglios Basales (GB).

La corteza cerebral de los mamíferos recibe aferencias de estructuras subcorticales como son el cerebelo y los ganglios basales. Proyectando nuevamente ambas estructuras la información procesada sobre la corteza cerebral vía los núcleos talámicos completando así el circuito sináptico (Allen y Tsukahara, 1974).

Los ganglios basales (GB) son una serie ricamente interconectado de núcleos del cerebro encontrado en el cerebro anterior y en el cerebro medio de mamíferos, aves y reptiles (Reiner *et. al.*, 1998). En muchas especies, incluyendo muchos mamíferos, el núcleo del cerebro anterior de los ganglios basales son la estructura subcortical telencefálica más prominente (Wilson, 2004).

Las conexiones anatómicas de los GB (Fig. 4) están involucrados en un número de paralelos y funcionalmente segregados circuitos cortico-subcorticales, los cuales soportan un amplio rango de funciones sensorial, motor, cognitivo, emocional y motivacional del cerebro (Groenewegen, 2003). Estas conexiones son mejor apreciadas dentro del contexto del arreglo de los distintos núcleos que componen a los GB. Las principales estructuras son el núcleo caudado, putamen, globo pálido (GP),

sustancia *nigra pars* y el subtálamo. Las principales aferentes a los GB son la corteza cerebral y el tálamo (Wilson, 2004).

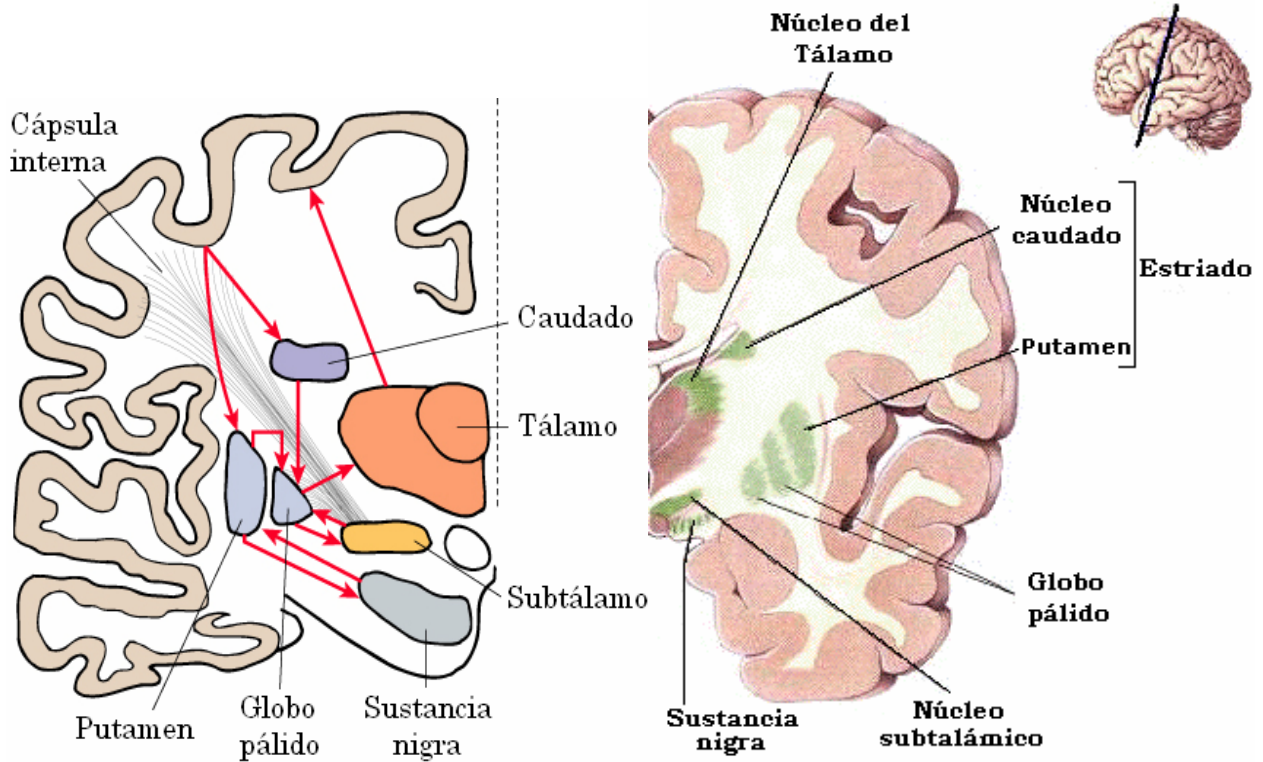


Figura 4. Organización funcional de los ganglios basales (GB). En el diagrama se observan las principales aferentes y eferentes (flechas rojas) a la izquierda y la compartimentalización de los ganglios basales (Modificado de Bear *et. al.*, 2001).

El neostriado.

El núcleo de entrada a los GB es el neostriado, que consiste del núcleo caudado, putamen y el núcleo *accumbens*. Estas tres estructuras son muy similares en su estructura interna. Dentro del núcleo caudado y el putamen, las entradas de las áreas sensorial, motora y de asociación cortical convergen con las entradas del núcleo talámico intralaminar y las aferentes dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNc).

Las salidas del neostriado se proyectan exclusivamente hacia otras estructuras de los GB. Los principales blancos de estos axones son tres núcleos: el segmento externo e interno del globo pálido (GPe, GPi respectivamente) y la sustancia *nigra pars* reticulada (SNr). Estas tres estructuras son muy similares en su organización celular (Shepherd, 2004).

Elementos neuronales en el neostriado.

La mayor parte de las neuronas en el neostriado son neuronas principales, también llamadas neuronas espinosas medianas (MSN; Fig. 5) de proyección, por el gran número de espinas dendríticas que cubren sus dendritas, el soma de estas células alcanzan de los 12 a 20 μm de diámetro. De las MSN por lo general parten cuatro o cinco ramas dendríticas, las cuales llegan a tener típicamente de 25 a 30 brazos dendríticos terminales, la densidad de espinas dendríticas incrementa rápidamente de la primera aparición de espinas, cerca de 20 μm del soma a una punta a una distancia de 80 μm del soma. Las MSN son neuronas de proyección, es decir que dejan el estriado para establecer sus conexiones en otros núcleos, formando las llamadas vías directa e indirecta del neostriado.

Interneuronas.

Estas células corresponden sólo una proporción pequeña de las células en el neostriado y no está claro que podría significar la existencia de diferentes tipos de interneuronas. Sólo tres tipos han sido examinados con suficiente detalle para ser caracterizadas tanto funcional como estructuralmente (Wilson, 2004).

Interneuronas colinérgicas: Representan menos del 2% de todas las células en el neostriado, esta neuronas tiene un elongado cuerpo celular (50-60 μm en longitud) con algunos grandes árboles dendríticos (0.5 a 0.75 mm). Los axones de estas neuronas pueden estar

mielinizados inicialmente pero pierden su mielina en las reducciones del diámetro axonal que ocurre en repetidas bifurcaciones (Wilson, 2004).

Interneuronas que contienen GABA y parvalbúmina. Interneuronas con una fuerte capacidad de tomar GABA exógeno. Representan del 3 al 5 % del total de la población neuronal.

Interneuronas que contienen somatostatina y óxido-nítrico sintetasa. Representan del 1 al 2 % de la población total de neuronas y son de tamaño medio con grandes y cortos brazos dendríticos y un campo axonal mas extendido que las interneuronas GABA/parvalbumina (Wilson, 2004).

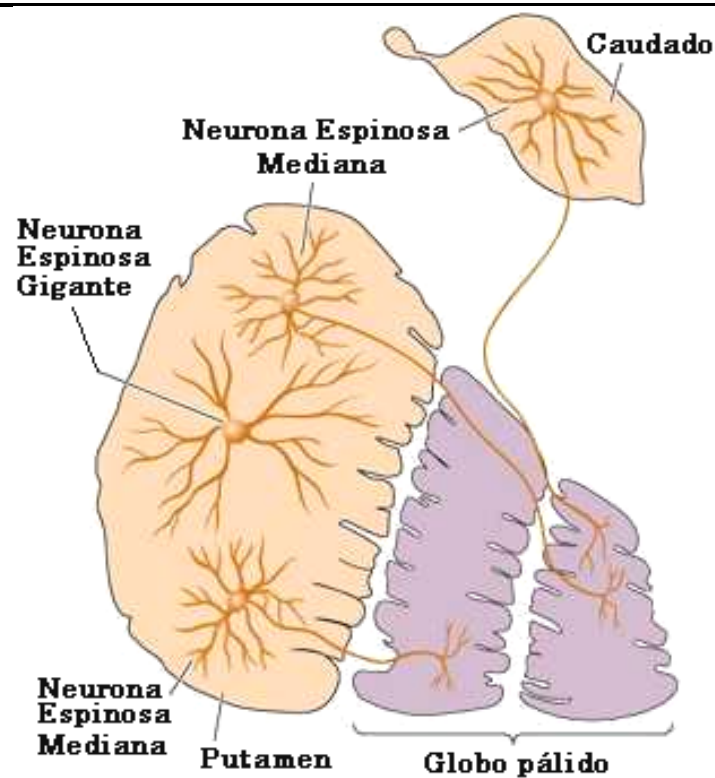


Figura 5. Elementos neuronales en el neostriado. Se observan las neuronas espinosas medianas (MSN) de proyección, llamadas así por el gran número de espinas dendríticas (Modificado de Bear *et. al.*, 2001).

JUSTIFICACIÓN

El mecanismo por el cual se produce modulación presináptica en la sinápsis corticoestriatal a través de la activación de los canales de potasio presinápticos aún no ha sido comprendido en su cabalidad. Los resultados de trabajos anteriores (Bargas *et. al*, 1998; Barral, 2001) han demostraron que solamente de manera parcial los canales de calcio están involucrados en la modulación; esto nos llevó a realizar el presente trabajo con el fin de determinar si los canales de potasio se encuentran presentes en las aferentes corticales que llegan al estriado y cuáles pudieran estar involucrados en la modulación.

La gran variedad de canales iónicos existentes en las células nerviosas y sus diversos papeles fisiológicos (por ejemplo los canales de potasio, importantes para la regulación de la neurotransmisión), son el blanco de varias enfermedades como la miastenia gravis o el síndrome de Lambert-Eaton por mencionar algunas. El estudio de estos canales posibilitaría el desarrollo de fármacos que pudieran activar o bloquearlos en regiones selectas del sistema nervioso y así tener un máximo de eficacias terapéuticas. Sin embargo, existe una dificultad significativa para la industria farmacéutica; el escaso conocimiento de los diferentes canales presinápticos, la identificación y la selección inicial de blancos moleculares para el desarrollo de nuevas drogas. Estos blancos moleculares tienen que reunir diferentes características como: conocer sus funciones biológicas, realizar ensayos *in vitro* y tienen que ser accesibles para pequeños componentes *in vivo*. Los canales iónicos tienen muchos de estos atributos y son vistos como puntos blancos de pequeñas drogas moleculares.

Por consiguiente, el incremento en el conocimiento de la estructura y función de los canales es de gran importancia, probablemente ayudará a identificar nuevas enfermedades producidas por alteraciones en los mismos y así desarrollar el diseño de nuevas terapias para los trastornos neurológicos.

Por lo que, con base a lo anterior se proponen los siguientes:

OBJETIVOS

GENERAL

- ❖ Identificar los canales de potasio presentes en las terminales sinápticas cortico-estriatales de la rata mediante el empleo de bloqueadores específicos.

PARTICULARES

- ❖ Analizar la acción de bloqueadores específicos de canales de potasio de la familia Kv sobre la modulación presináptica en la sinápsis cortico-estriatal de rata.
- ❖ Determinar si los canales de potasio identificados se encuentran en la porción presináptica o postsináptica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Organismos.

En nuestro laboratorio, así como en la institución se han tomado provisiones para evitar el sufrimiento de los animales utilizados en este estudio bajo la normatividad nacional e internacional para la realización de experimentos con animales (Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999; Guide for the Use and Care of Laboratory Animals, Society For Neurosciences). Se utilizaron ratas macho Wistar de 100 a 120 g de peso (n= 40), con alimentación *ad libitum*. Bajo anestesia, se extrajo el cerebro y se colocó en solución salina isotónica (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucosa, 0.2 mM tiourea y 0.2 mM ascorbato) saturada, con una mezcla de Carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂); mantenida a un pH de 7.4 y una temperatura de 4 ± 1 °C. Posteriormente, se separaron los bulbos olfatorios, cerebelo y los hemisferios cerebrales de los cuales se obtuvieron las rebanadas sagitales de 400 µm de espesor con un vibratomo (Campden Instrument, UK). Las rebanadas se colocaron y mantuvieron en incubación (en solución salina isotónica) a temperatura ambiente en un periodo no menor a 60 min. 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.

De las rebanadas obtenidas, una de ellas se colocó en la cámara de registro a la cual se le hizo pasar un flujo constante de solución salina 1.0 ± 0.1 ml/min previamente gaseada con oxígeno, a una temperatura constante de 34 ± 0.5 °C. Bajo estas condiciones se realizó todo el experimento.

Los estímulos se mandaron con ayuda de un electrodo concéntrico bipolar, el cual se colocó entre el cuerpo caloso y el estriado, de esta manera se estimularon las fibras corticales aferentes al neostriado. Los estímulos se mandaron digitalmente con auxilio de la computadora, pasándolos a través de una unidad aisladora (Digitimer DS2) en donde se reguló la intensidad (0-25 Volts), la

duración (0.01-0.04 ms) y la frecuencia (0.4-0.06 Hz). Los potenciales de campo fueron registrados mediante un microelectrodo de vidrio (obtenido a partir de un capilar estirado por calentamiento de 1.0 mm de diámetro externo), 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 y se digitalizó.

Procesamiento de datos.

La señal electrofisiológica obtenida fue transferida a una computadora PC mediante el uso de programas diseñados en un ambiente LabView. Cada trazo registrado fue medido, promediado, analizado y graficado mediante el programa Origin (v 7.5 Microcal Software, Northampton, MA. U.S.A).

Protocolo Experimental.

Para evaluar los eventos presinápticos así como también la participación de los canales de potasio presinápticos, se emplean técnicas electrofisiológicas indirectas ya que no es posible introducir un electrodo de registro en las terminales. Para el presente 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, 2001).

Para entender este paradigma se han planteado varias hipótesis, quizás la hipótesis más aceptada sea la del calcio (Ca^{2+}) residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's (Katz y Miledi, 1968; 1970) la cual se basa en la afirmación de que la entrada de Ca^{2+} es esencial para la liberación de neurotransmisor. En ese sentido, una sustancia que produzca la inactivación de corrientes de K^+ en la terminal presináptica, provocaría incremento en el influjo de Ca^{2+} extracelular (Andrew y Dudek, 1985; Miller, 1998). Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco estudiada y de

modo que cuando se bloquea las conductancias de potasio, la concentración de Ca^{2+} se incrementa en el interior de la célula, debido a que los canales de Ca^{2+} que se encuentran en la terminal sináptica permanecen más tiempo abiertos (Fig. 6; Barral, 2001).

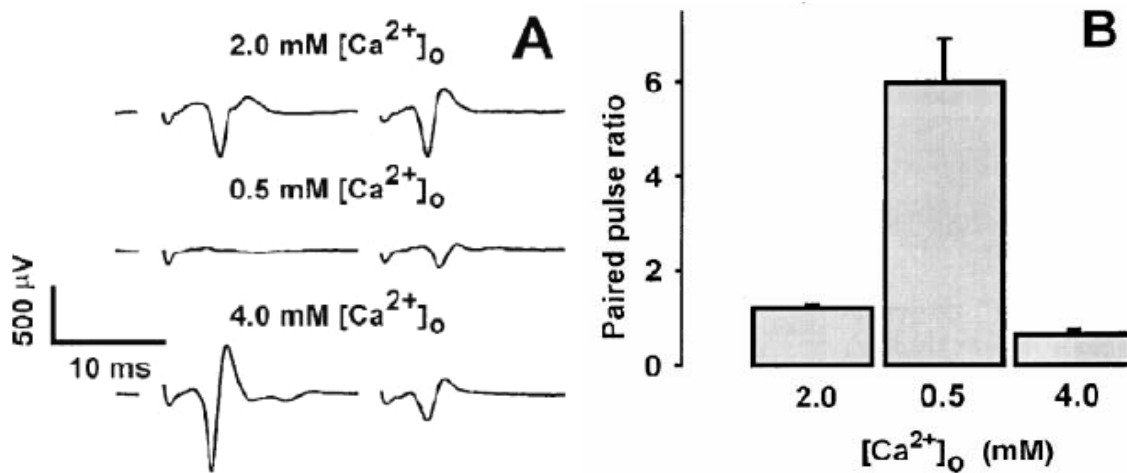


Figura 6. Protocolo por pulso pareado. En A, principales trazos que muestran el efecto a diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular. En B se muestra el radio por pulso pareado a diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Nótese que a mayor $[\text{Ca}^{2+}]_o$ se produce depresión por pulso pareado (DPP) mismo que ocurre si se bloquean los canales de potasio presinápticos (Tomado de Barral *et. al.*, 2001).

Pequeñas modificaciones en la concentración de Ca^{2+} celular bastan para alterar sensiblemente la aparición espontánea de potenciales miniatura, y por lo tanto liberación de neurotransmisor (Del-Castillo y Katz, 1954a; Del Castillo y Katz, 1954b). Por lo tanto, cuando se mandan trenes de estímulos a intervalos cortos de tiempo se observa ya sea un progresivo incremento (facilitación, aumentación o potenciación), o bien un decremento en la amplitud de las respuestas sinápticas (depresión). Esto quiere decir que grandes cambios en la liberación de neurotransmisor pueden deberse a pequeños cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} seguida de un pulso nervioso, como se muestra en la figura 6 (Barral *et. al.*, 2001). Para el protocolo de facilitación por pulso pareado se mandan dos estímulos (S_1 y S_2), cercanos en el tiempo (10-200 ms). La primera respuesta al primer estímulo es el componente S_1 (condicionante) y la segunda S_2

(condicionado) como se muestra en la figura 7 (Dunwiddie y Hass, 1985; Hernández-Echegaray, 1998; Barral, 2001).

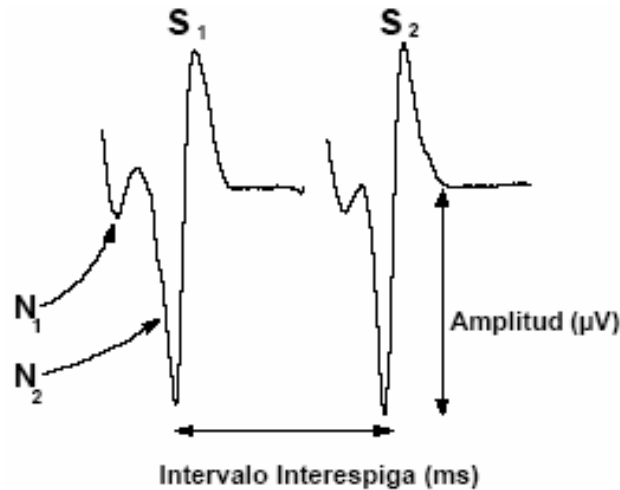


Figura 7. Registro extracelular de un potencial de campo en estriado de rata. Se pueden observar dos negatividades (N₁ y N₂), la primera es en respuesta al potencial antidrómico que corresponde a la información que va del axón a las dendritas y que aparece aproximadamente de 2 a 4 ms después del artefacto de estimulación. La segunda negatividad corresponde al potencial sináptico que aparecen a los 4 a 8 ms, y se obtiene cuando las aferentes corticales que llegan al árbol dendrítico o al soma de las neuronas estriatales generan un potencial postsináptico (Malenka y Cósix, 1988). También se muestran dos registros (S₁ y S₂) separados por un intervalo de tiempo, para observar la facilitación por pulso pareado a través del cambio en las amplitudes de la espiga.

Los experimentos se realizaron en presencia de Bicuculina 10 µM que es un bloqueador específico del receptor GABA_A, para eliminar el componente inhibitorio y obtener solo el componente glutamatergico (Nisenbaum *et. al.*, 1992; Bargas *et. al.*, 1998; Barral, 2001). 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):

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

Que expresado en porcentaje es:

$$\%PPF = \left(\frac{S_2}{S_1} - 1 \right) \times 100$$

Para buscar la actividad neuronal, se aplicaron dos estímulos con una intensidad inicial de 20 V, una duración de 0.1 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 disminuyó 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.

Fármacos Utilizados.

Para la realización del presente trabajo, se llevaron a cabo experimentos de oclusión farmacológica utilizando Bicuculina, antagonista GABA_A adquiridos de SIGMA (St Louis, Mo) y bloqueadores específicos de canales de potasio proporcionados por Alomone Labs (Tabla 2). Todos ellos se prepararon en soluciones stock y disueltos en la solución salina, se administraron a la preparación a través del dispositivo de perfusión.

TABLA II

Toxina	IC50	Bloquea	Referencia
Apamina	100 nM- 1 μ M	SK, Kca 2.1, 2.2	Nagayama <i>et. al</i> 2000; Strøbæk D. <i>et. al.</i> 2000 ; Barfod <i>et. al.</i> 2001.
IbTX	5-50 nM	BK	Galvez <i>et. al.</i> 1990; Koschak <i>et. al.</i> 1997; Meera <i>et. al.</i> 2000.
α -DTX	10 nM- 0.5 μ M	Kv 1,1, 1.2	Benishin <i>et. al.</i> 1988; Harvey, 2001.
β -DTX	10-100 nM	Kv 1,1, 1.2	Benishin <i>et. al.</i> 1988; Harvey, 2001.
γ -DTX	10-100 nM	Kv 1,1 +, 1.2-	Benishin <i>et. al.</i> 1988; Harvey, 2001.
δ -DTX	10-100 nM	Kv 1,1, 1.2-	Benishin <i>et. al.</i> 1988; Imredy <i>et. al.</i> 1998; Harvey, 2001.
DTX I	10-100 nM	Kv 1,1, 1.2	Schweitz <i>et. al.</i> 1990; Hopkins, 1998; Harvey, 2001.
DTX K	10 nM	Kv 1,1++, 1.2-	Schweitz <i>et. al.</i> 1990; Owen <i>et. al.</i> 1997; Southan y Robertson, 1998; Wang <i>et. al.</i> 1999a.
TsTX K α	5-50 nM	Kv 1,2	Werkman <i>et. al.</i> 1993; Rogowski <i>et. al.</i> 1994.
MgTX	1-10 nM	Kv 1,3, 1.6	Leonard <i>et. al.</i> 1992; García-Calvo <i>et. al.</i> 1993.
AgTX	50 pM-10 nM	Kv 1,3	García <i>et. al.</i> 1994.
BDS I y II	100 nM- 5 μ M	Kv 3,4	Diochot <i>et. al.</i> 1998.
Tertiapina	50-100 nM	GIRK 1/2	Jin <i>et. al.</i> 1999; Drici <i>et. al.</i> 2000; Kitamura <i>et. al.</i> 2000; Peleg <i>et. al.</i> 2002.

Bloqueadores específicos de Canales de Potasio. Los signos (-, +, ++) muestran la afinidad de la toxina por dicho canal de menor a mayor afinidad. Abreviaturas: IbTX, Iberiotoxina; DTX, Dendrotoxina; TsTX K α , Tityustoxina K α ; MgTx; Margatoxina; AgTX, Agitoxina; BDS, Blood Depressing Substance.

Análisis de Datos.

La significancia estadística de los cambios observados con el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP), se examinó en cada experimento sobre el mismo tejido; siendo éste su propio control. Los cambios en la facilitación por pulso pareado se expresaron en porcentajes y se aplicaron pruebas no paramétricas (Test de Wilcoxon). Utilizando software comercial Minitab (State College, PA) (Brown y Rhotery, 1993; Daniel 2002) y SYSTAT (Evanston, IL, USA).

RESULTADOS

El bloqueo de canales de potasio mediante el empleo de bloqueadores tanto inespecíficos como específicos produjo depresión por pulso pareado (DPP), tal como se había sugerido previamente (Barral *et. al*, 2001).

Protocolo por pulso pareado.

El protocolo experimental realizado en el presente trabajo, se ha llevado a cabo para el estudio de eventos presinápticos. En la figura 8 se muestra la manipulación experimental de los canales de potasio y calcio, ya que 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 (Katz y Miledi, 1968; 1970). Como se puede observar, el bloqueo de canales de K^+ con Ba^{2+} produce un decremento en la FPP conocido como Depresión por Pulso Pareado (DPP), posteriormente el bloqueo de canales de Ca^{2+} con Cd^{2+} produce un incremento en la FPP. De modo que estos datos sugieren que por medio de esta manipulación farmacológica, ambos tipos de canales (Ca^{2+} y K^+) están presentes en las terminales sinápticas.

Este protocolo ha sido utilizado junto con el registro extracelular, siendo muy sensible para detectar dichos eventos (Barral, 2001; Barral, *et. al*, 2001) y donde al manipular ciertos parámetros, dicha evidencia es más directa.

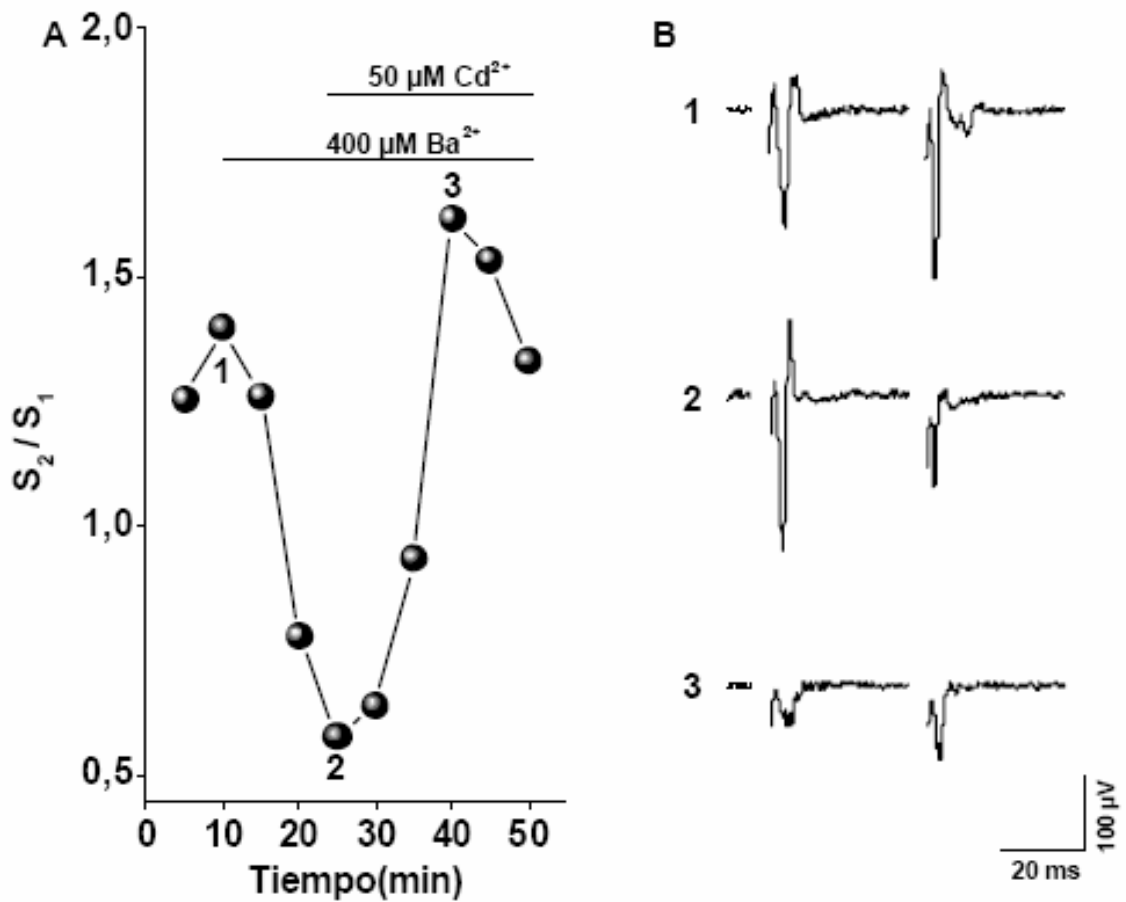


Figura 8. Protocolo de Facilitación por pulso pareado. Los canales de potasio y calcio participan en la probabilidad de liberación del transmisor glutamato en las aferentes cortico-estriatales. En A se observa el curso temporal de un experimento representativo del bloqueo realizado por el Bario (Ba^{2+}) un bloqueador no específico de los canales de potasio y de Cadmio (Cd^{2+}) un bloqueador no específico de canales de calcio. La barra indica el tiempo en que fueron administrados los bloqueadores y los números indican los puntos del experimento que fueron tomados para representarse en B. Se puede observar el cambio en las amplitudes en el transcurso del experimento. En B se muestran trazos representativos del experimento.

Efecto con bloqueadores no específicos.

Para determinar si los diferentes tipos de canales de potasio participan en la modulación de la liberación del neurotransmisor en la sinápsis cortico-estriatal de rata se ocuparon antagonistas no específicos: Tetraetilamonio, Bario, Cesio y 4-Aminopiridina (Fig. 9).

La figura 9 muestra el curso temporal de los diferentes experimentos, las barras indican el momento en el que fue administrado el bloqueador y a que concentración. Se puede observar un mayor efecto en el bloqueo de los canales de potasio por TEA, Cesio y 4-AP lo que nos sugiere la participación de estos canales en la liberación del neurotransmisor.

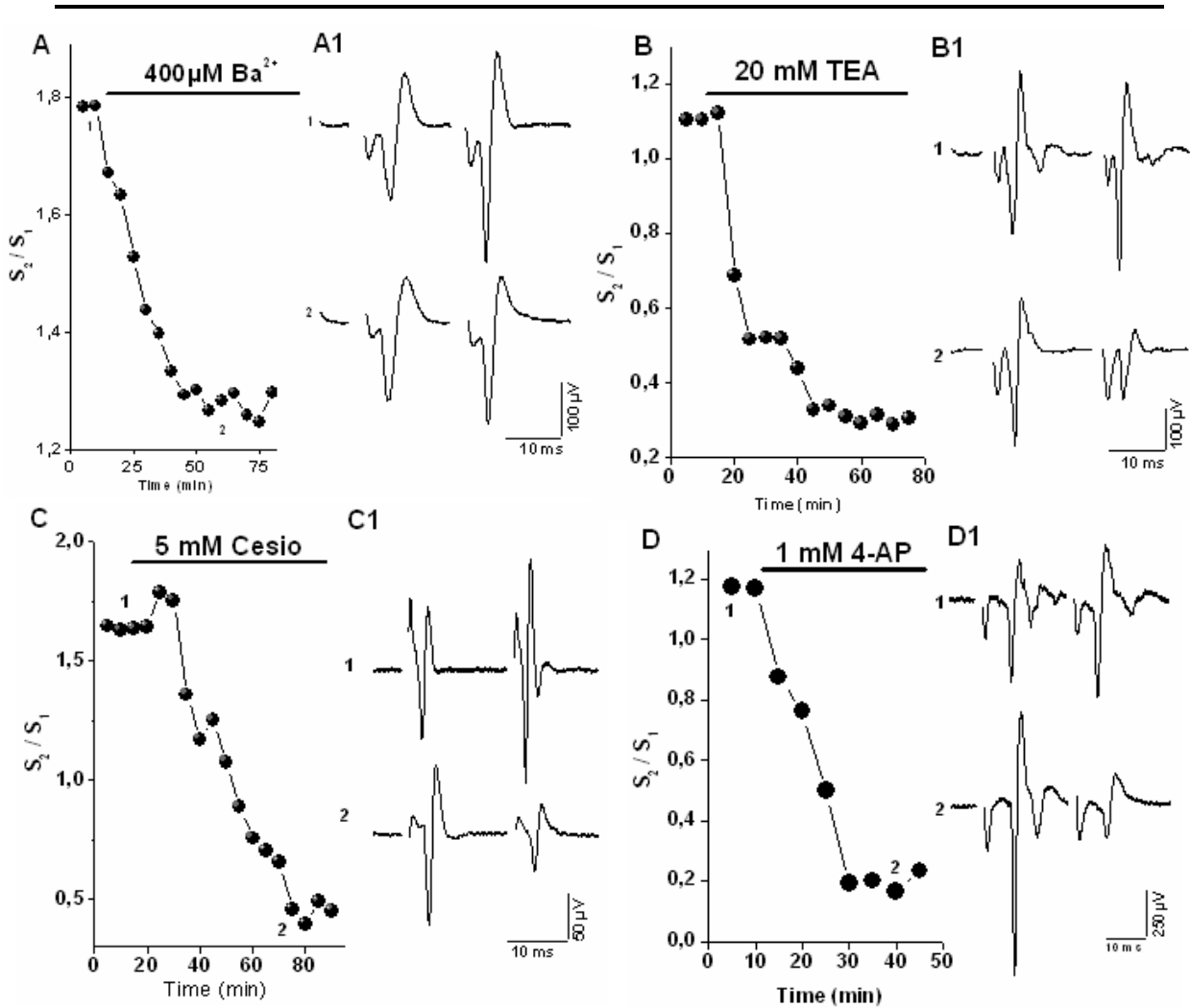


Figura 9. Efecto del bloqueo de los canales de potasio con bloqueadores no específicos. Se observa el curso temporal (A, B, C y D) y trazos representativos de cada bloqueador (A1, B1, C1 y D1) respectivamente. Las barras indican la aplicación del agente bloqueador. Abreviaturas: Ba^{2+} ; Bario, TEA; Tetraetilamonio y 4-AP, 4-Aminopiridina. (José, 2005)

Efecto de las Dendrotoxinas (DTX's).

Para confirmar la presencia de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv 1 en las terminales sinápticas cortio-estriatales, se aplicaron las diferentes dendrotoxinas (DTX's), las cuales produjeron DPP. En la figura 10, se observa los cambios en la relación de las amplitudes S_2/S_1 durante la aplicación de las diferentes toxinas; mientras que en la tabla 3 se muestra los distintos valores obtenidos del análisis estadístico de cada toxina.

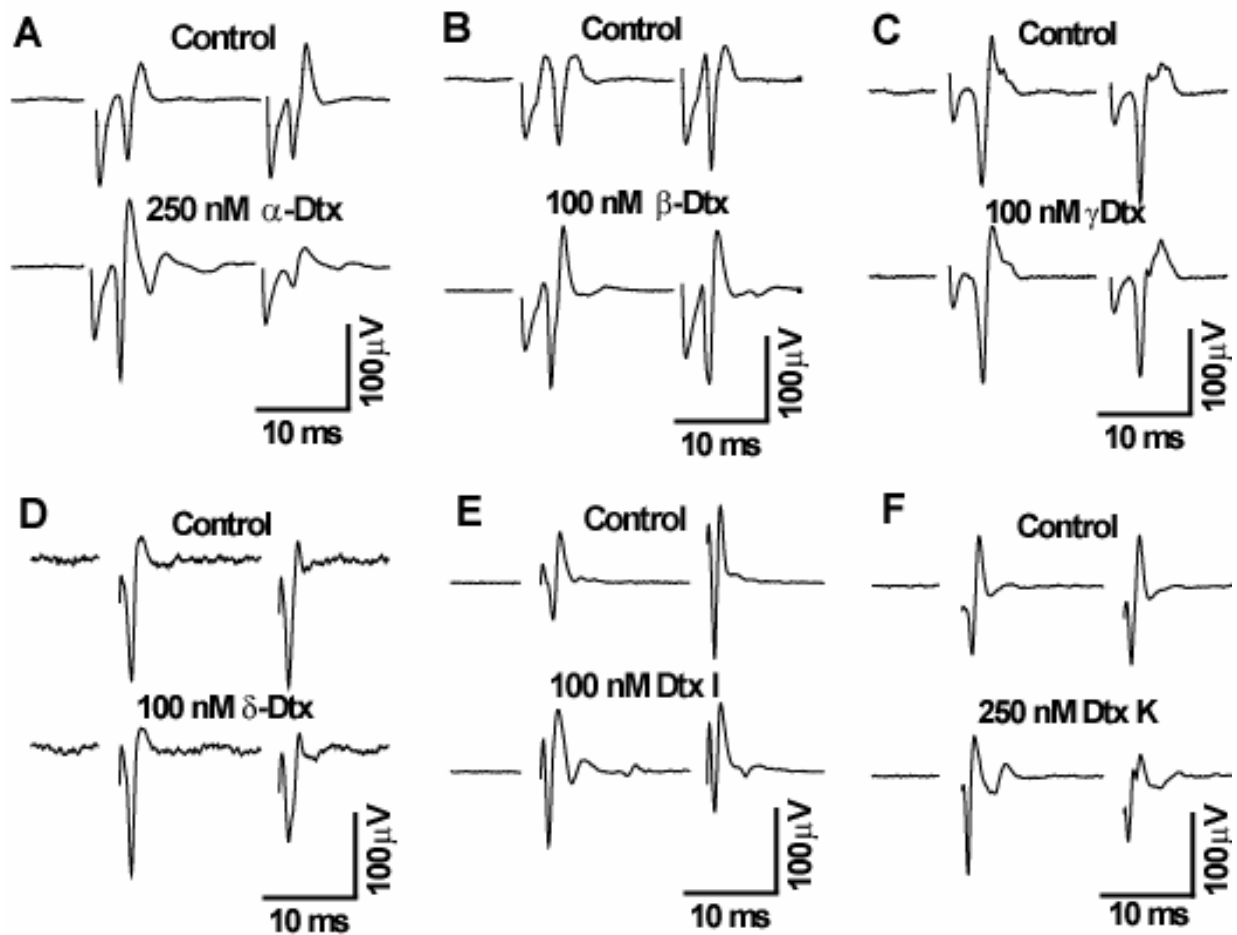


Figura 10. Efecto del bloqueo de las diferentes dendrotoxinas (DTX's). Trazos representativos mostrando el control y la depresión por pulso pareado (DPP) producido por la aplicación de cada una de las diferentes dendrotoxinas.

Como se muestra en la figura 10C, la DPP provocada por la γ -DTX indica la presencia del canal Kv 1.1; lo que apoya la DPP inducida por la DTX_K, ya que esta dendrotoxina es muy específica y su interacción con estos canales de potasio requiere de la presencia de homómeros de dicho canal (Wang *et. al.*, 1999a; Wang *et. al.*, 1999b).

TABLA III

Dendrotoxina (Figura)	Depresión por pulso pareado (DPP) con respecto al control
α -DTX (10A)	-37.2 \pm 22.1 % (n=3; p = 0.25; Wilcoxon)
β -DTX (10B)	-22.4 \pm 8.1 % (n=3; p = 0.5; Wilcoxon)
γ -DTX (10C)	-21.9 \pm 0.4 % (n=3; p = 0.5; Wilcoxon)
δ -DTX (10D)	-4.2 \pm 33.5 % (n=3; p = 1.00; Wilcoxon)
I-DTX (10E)	-62.8 \pm 4.8 % (n=3; p = 0.125; Wilcoxon)
K-DTX (10F)	-41.7 % (n=1)

Valores de Depresión por Pulso Pareado (DPP). La aplicación de 100 nM (β , γ , δ e I) y de 250 nM (α y K) de DTX's para bloquear los canales Kv 1.1 y Kv 1.2, produjo un cambio en la relación S₂/S₁ en el que el signo negativo indica una DPP. Abreviaciones: n, número de repeticiones; p, probabilidad.

Efecto de la Tityustoxina K α .

La Tityustoxina K α (TsTX K α) es un bloqueador específico para los canales Kv 1.2, en la figura 11 se muestra un incremento en la FPP; lo que sugiere que estos canales no están presentes en la terminal presináptica cortico-estriatal, por lo que la toxina probablemente estaría actuando de manera indirecta. Por otra parte, se observa un cambio en la relación de las amplitudes S₂/S₁ durante la aplicación de la Tityustoxina K α y se aprecia un aumento de la facilitación por pulso pareado (FPP) con respecto al control de 153.5 \pm 97.8 % (n=3; p = 0.5; Wilcoxon).

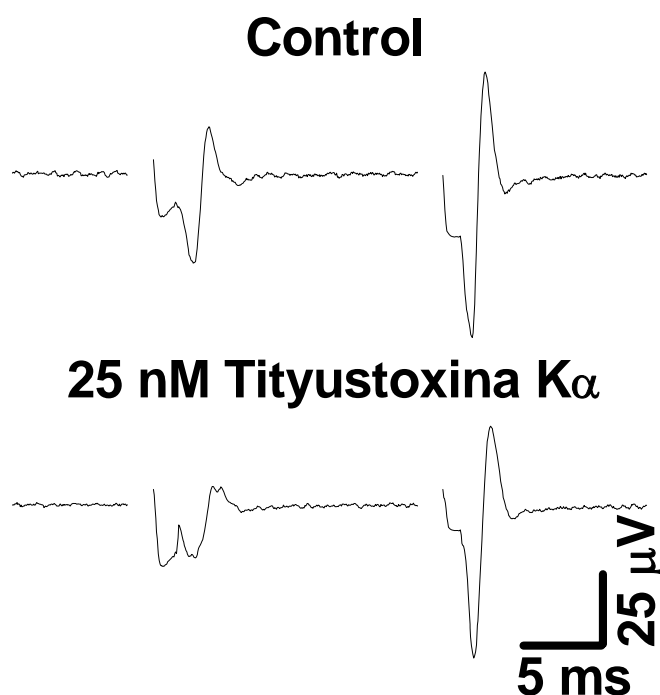


Figura 11. Efecto de la Tityustoxina K α (TsTX K α). Trazos representativos mostrando el control y la facilitación por pulso pareado (FPP) producido por la aplicación 25 nM de Tityustoxina K α .

Efecto de la Agitoxina y Margatoxina.

Los canales Kv 1.3 son bloqueados por la Agitoxina y su aplicación produjo un cambio en la relación de las amplitudes S_2/S_1 con respecto al control de $-33.6 \pm 18.2 \%$ ($n = 3$; $p = 0.5$; Wilcoxon) como se observa en la figura 12A. El signo negativo indica una depresión por pulso pareado (DPP).

Mientras en la figura 12B se muestra la DPP inducida por la aplicación de 1 μ M de MgTX, dosis que bloquea específicamente los canales Kv 1.3 y Kv1.6 El cambio de las amplitudes observado en la relación S_2/S_1 fue de -31.3% ($n = 1$) con respecto al control.

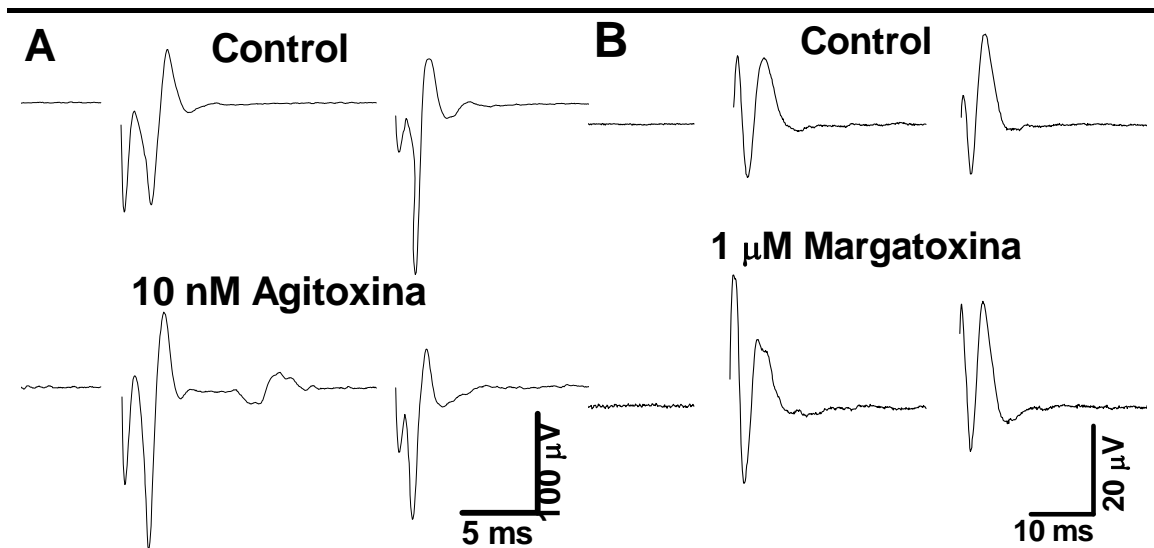


Figura 12. Efecto de la Agitoxina y Margatoxina. En A, trazos representativos mostrando el control y la depresión por pulso pareado (DPP) producido por la aplicación de 10 nM de Agitoxina y 1 μM de MgTX.

Efecto de la Iberiotoxina y Apamina.

La respuesta a la aplicación de Iberiotoxina (IbTX) a 20 nM, indica la presencia de los canales de potasio dependientes de calcio de gran conductancia, los llamados BK; puesto que estos canales son sensibles a este bloqueador (Galvez *et. al.* 1990; Koschak *et. al.* 1997; Meera *et. al.* 2000). En la figura 13A, el cambio en la relación de las amplitudes S_2/S_1 durante la aplicación de la IbTX fue de una disminución en la facilitación por pulso pareado (FPP) de $-15.5 \pm 0.8 \%$ ($n = 3$; $p = 0.25$; Wilcoxon) con respecto al control.

Con respecto a los canales de potasio dependientes de calcio de pequeña conductancia o SK 2.1 y 2.2 son bloqueados por la Apamina. En la figura 13B, se observa un cambio en la relación de las amplitudes S_2/S_1 durante la aplicación de 100 nM de Apamina y se aprecia un incremento en la FPP con respecto al control de $66.4 \pm 25.2 \%$ ($n = 3$; $p = 0.25$; Wilcoxon), lo que sugiere que dichos canales podrían estar en la parte postsináptica o en otra terminal nerviosa.

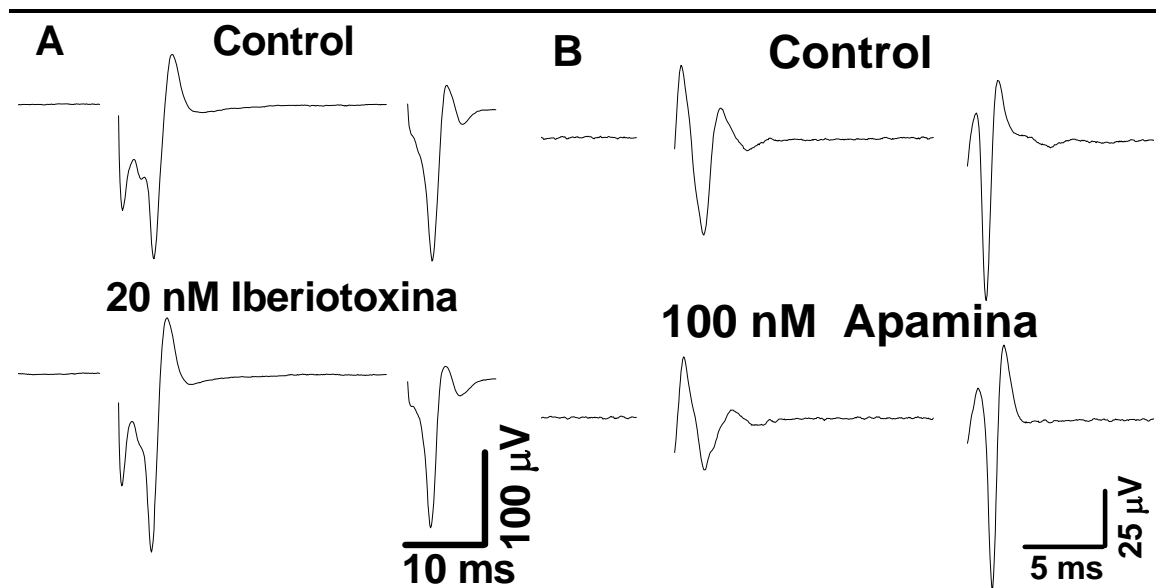


Figura 13. Efecto de la Iberiotoxina (IbTX) y Apamina. Trazos representativos mostrando el control y la depresión por pulso pareado (DPP) producido por la aplicación de la IbTX a una concentración de 20 nM (A) y de la facilitación por pulso pareado (FPP) inducida por 100 nM de Apamina (B).

Efecto de la BDS I y II.

Los canales Kv 3.4 son bloqueados por la toxina *Blood Depressing Substance I y II* (BDS I y II) y en la figura 14 se observa un cambio en la relación de las amplitudes S_2/S_1 durante la aplicación de 47 nM de BDS I (Rudy *et. al*, 1999) y se aprecia una disminución en la facilitación por pulso pareado (FPP) con respecto al control de $-33.9 \pm 13.8 \%$ ($n = 3$; $p = 0.25$; Wilcoxon).

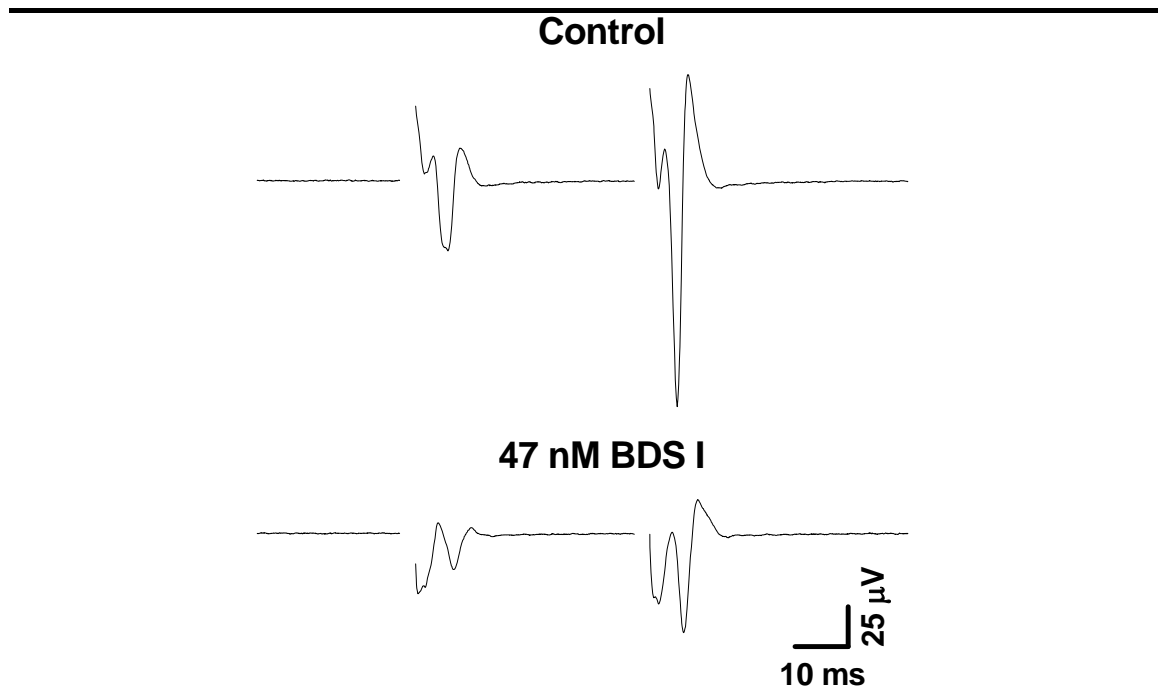


Figura 14. Efecto de BDS I. Trazos representativos mostrando el control y la depresión por pulso pareado (DPP) producido por la aplicación de 47 nM de BDS I.

Efecto de la Tertiapina.

La FPP producida por la Tertiapina hace referencia a que los canales de potasio rectificadores entrantes acoplados a proteínas G, GIRK 1/2. En la figura 15, se observa un cambio en la relación de las amplitudes S_2/S_1 durante la aplicación de la Tertiapina y se aprecia un incremento en la FPP con respecto al control de $11.6 \pm 19.2\%$ ($n = 4$; $p = 0.625$; Wilcoxon), lo que sugiere es que estos canales se encuentran en la parte postsináptica o en otra terminal nerviosa que afecte de manera indirecta a la sinapsis cortico-estriatal.

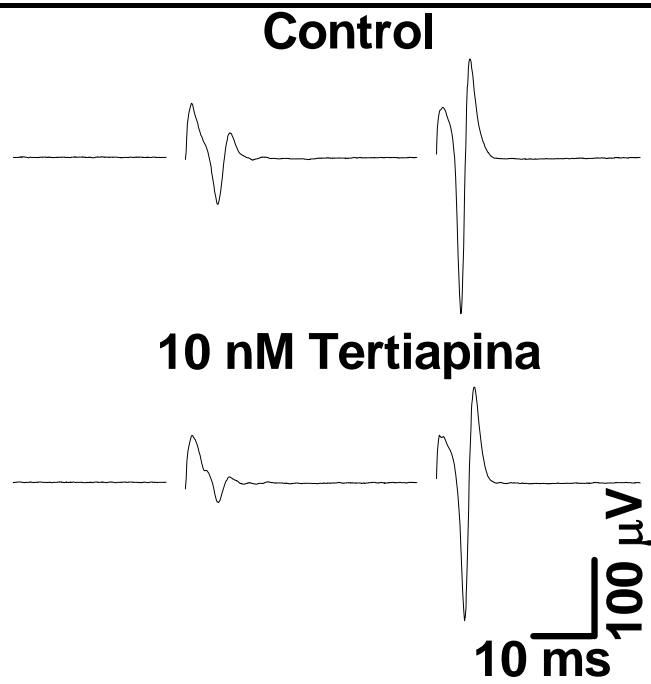


Figura 15. Efecto de la Tertiapina. Trazos representativos mostrando el control y la facilitación por pulso pareado (FPP) producido por la aplicación de 10 nM de Tertiapina.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se mostró que con auxilio de bloqueadores específicos y del protocolo experimental de pulso pareado, es posible evidenciar eventos presinápticos y por lo tanto detectar la presencia de canales de potasio en las terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza y que realizan sinápsis con las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado de la rata. El protocolo de pulso pareado ha sido muy utilizado para detectar la presencia de diferentes estructuras presinápticas, en donde manipulamos ciertos parámetros para que la evidencia sea más directa. Como se mostró en la figura 9, donde se manipularon canales de potasio que se encuentran en la terminal cortico-estriatal, por medio de experimentos de oclusión farmacológica con bloqueadores inespecíficos de dichos canales.

En esta figura se aprecia claramente que cuando se adicionan los bloqueadores (TEA, Bario, Cesio y 4-AP) la DPP aumenta, lo que indica que se lleva a cabo una mayor liberación del neurotransmisor. En otras palabras hubo un incremento en la respuesta S_1 con respecto a la respuesta S_2 esto es debido a que al bloquear los canales de potasio la terminal sináptica permanece más tiempo despolarizada lo cual permite que los canales de calcio dependientes de voltaje estén abiertos por más tiempo y por lo tanto, al entrar más calcio a la terminal nerviosa se libera el neurotransmisor.

Para comprobar si el efecto de los diferentes bloqueadores fue presináptico o postsináptico se utilizó el pulso pareado entre las amplitudes del segundo y primer estímulo, ya que una disminución en la FPP es consistente con un incremento en la probabilidad de liberación del transmisor en la terminal sináptica (Barral *et. al*, 2001).

Bloqueo con Dendrotoxinas.

Las dendrotoxinas son pequeñas proteínas que fueron aisladas hace 20 años del veneno de la serpiente mamba (*Dendroaspis sp*; Harvey, 2001). Las DTX's α , δ y κ principalmente, son utilizadas en estudios inmunohistoquímicos y electrofisiológicos para caracterizar los canales de potasio de la familia Kv 1 en diferentes estructuras cerebrales. Las dendrotoxinas bloquean subtipos particulares de canales de potasio dependientes de voltaje en neuronas. Estudios con canales de K^+ clonados, indican que la α -DTX (obtenida del veneno de la mamba verde *Dendroaspis angusticeps*) bloquea los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6 cuando se utiliza a concentraciones nanomolares, la κ -DTX se obtiene de la mamba negra (*Dendroaspis polylepis*) preferencialmente bloquea los canales Kv1.1 (Harvey, 2001).

Wang, *et. al* (1999b) mostró que la DTX $_{\kappa}$ solo puede unirse a los oligómeros de los canales de potasio Kv 1.1 que son constituyentes dominantes y ha sido el primero en establecer por registros electrofisiológicos que la habilidad de esta toxina para reconocer estos canales es determinada por las regiones 3₁₀ hélice y giro β de la toxina y por ende importantes para unirse al poro de estos canales en la membrana sináptica. Asimismo, confirmó la importancia de la región giro- β para la habilidad de la toxina de bloquear las corrientes de potasio en ovocitos expresando canales de potasio Kv1.1, además de que el residuo de lisina cerca del amino terminal es importante para la α -dendrotoxina, δ -dendrotoxina y la κ -dendrotoxina; y que diferentes residuos adicionales en cada toxina juega un papel en la unión de las mismas individualmente para su sitio. Por otra parte, el residuo de leucina en posición 7 de δ -dendrotoxina ha sido predicho para ser el unidor crítico (Wang *et al.* 1999b).

Los canales Kv sensibles a α -DTX ocurren como una asociación estrecha de estructuras oligoméricas en una estequiometría de en subunidades de 4 α y 4 β . Esto ha sido sugerido que el ensamble homo y heteromultimérico o contener diferentes isoformas de las subunidades α y β

pueden contribuir a la enorme diversidad de canales Kv observados en el sistema nervioso de mamíferos (Pongs, 1995).

Bloqueo con Tityustoxina K α .

Las conductancias de potasio dependientes de voltaje juegan múltiples papeles en la regulación de la excitabilidad neuronal. La Tityustoxina K α (TsTX K α) es un bloqueador específico para los canales que contienen subunidades Kv 1.2 (Hopkins, 1998) aislado de *Tityus serrulatus*. La FPP observada por la aplicación de la TsTX K α sugieren su participación indirecta en la sinapsis cortico-estriatal y que su localización es poca o nula en la presinápsis. Dodson *et. al* (2003) utilizó el cáliz de Held para examinar el papel de los canales Kv 1.2 y reportó que estos canales tienen una función general presináptica en suprimir la hiperexcitabilidad terminal durante la despolarización después de un potencial y su localización exclusiva en la zona de transición entre el axón y la terminal, pero son excluidos de la terminal.

Esta observación podría tener implicaciones terapéuticas para una regulación selectiva de excitabilidad presináptica *versus* postsináptica; debido a que los canales Kv 1.2 previenen errores durante disparos repetitivos de potenciales de acción.

Bloqueo con Agitoxina y Margatoxina.

La agitoxina (AgTX) es un potente péptido bloqueador de los canales Kv 1.3, este bloqueador es obtenido de *Leiurus q. hebraeus*. Gao y García (2003) analizaron el complejo canal-péptido (Kv1.3-AgTX) y predijeron una nueva interacción unidora con el hidrógeno entre el lado Asn30 de la cadena del péptido y el lado Asp381 de la cadena del canal. Esto es consistente con la DPP que se observó al aplicar 10 nM de esta toxina y así evidenciar su presencia presináptica en la preparación cortico-estriatal. Por otro lado, la margatoxina (MgTX) es aislada del veneno del escorpión (*Centruroides margaritatus*) e inhibe los canales Kv 1.3 y Kv 1.6. Fischer y Saria (1999)

evaluaron el efecto de esta toxina sobre el flujo exterior de acetilcolina en rebanadas estriatales de rata y muestran que la inhibición de canales de potasio sensibles a MgTx [100 nM] induce una concentración-dependiente en la liberación espontánea de acetilcolina; mientras que incrementa la espontánea y la evocación eléctricamente de la liberación de [3H]dopamina demostrando su papel en la repolarización de proyecciones nigroestriatales y una alta densidad de expresión de sitios de unión para la MgTX en el estriado de rata (Saria *et. al.*, 1998).

Los canales Kv son críticos para una amplia variedad de procesos y juegan un papel esencial en la regulación de la excitabilidad neuronal (Cheng *et. al.*, 2001; Dodson y Forsythe, 2004)

Bloqueo con Iberiotoxina y Apamina.

Los canales BK son ampliamente expresados en el SNC y son importantes estos canales ya que controlan la liberación del neurotransmisor como lo demostró Raffaelli *et. al.* (2004) en cultivos de rebanadas de hipocampo de rata en conexiones CA3-CA3. Asimismo, contribuyen ampliamente a la repolarización del potencial de acción en el soma pero no en el axón de las terminales de células piramidales de CA3 bajo condiciones basales (Hu *et. al.*, 2001) lo que indica que el papel funcional de los canales BK depende de su localización subcelular. Estudios de auto-radiografía revelan los altos niveles de expresión de canales BK en las capas externas de la neocorteza, vías de proyecciones perforantes hipocampales y el núcleo interpeduncular (Wanner *et. al.*, 1999).

El incremento en la transmisión sináptica inducida por la IbTX (toxina aislada del alacrán *Buthus tamulus*) fue acompañada por una reducción en la facilitación por pulso pareado lo que indica una mayor probabilidad de liberación del transmisor por los canales BK conformados por homómeros con subunidades α y $\beta 1$ (Meera *et. al.*, 2000). Una particularmente interesante posibilidad, es que los canales BK presinápticos pueden servir como un freno de emergencia, protegiendo contra hiperactividad, excitotoxicidad y muerte celular bajo condiciones patológicas

(Hu *et. al.*, 2001). Por lo tanto nuestro estudio sugiere para nuestro conocimiento la presencia de los canales BK en el cuerpo estriado predominantemente en localización presináptica.

Por otra parte, la apamina (una toxina péptido contenida en el veneno de abeja, *Apis mellifera*) es un ligando con una alta afinidad que bloquea (inhibe) a los canales SK; ha sido ampliamente usada para caracterizar su función y propiedades electrofisiológicas (Hugues *et. al.*, 1982a; Hugues *et. al.*, 1982b; Roncarati *et. al.*, 2001). Los canales SK son importantes en el SNC para generar los postpotenciales hiperpolarizantes que siguen después de un potencial de acción (Roncarati *et. al.*, 2001; Obermair *et. al.*, 2003). Tres isoformas de los canales SK (SK1, SK2 y SK3) son diferencialmente distribuidos a través del cerebro, pero poco es conocido acerca de su expresión específica en compartimentos neuronales particulares (Obermair *et. al.*, 2003). Estos canales son activados por incrementos submicromolares en la concentración intracelular de Ca^{2+} y calmodulina, insensibles al voltaje, altamente selectivos para el K^+ (Roncarati *et. al.*, 2001).

Obermair y colaboradores (2003) localizó los canales SK en la terminal nerviosa presináptica en sinápsis excitatorias de hipocampo, sin preferencia por neuronas postsinápticas glutamatérgicas o GABAérgicas, mientras que Roncarati *et. al.* (2001) en sus experimentos de la unión neuromuscular de rata, la distribución de estos canales iónicos en la membrana postsináptica es organizada para la recepción de la señal de activación de la neurona motora y para su amplificación y propagación al resto de la fibra.

Bloqueo con BDS I y II.

Varias neuronas in el SNC de mamíferos han incorporado dentro de su repertorio de conductancias dependientes de voltaje un relativamente gran número de canales Kv3 para posibilitar disparos repetitivos a altas frecuencias, una habilidad que crucialmente depende sobre las propiedades especiales de los canales Kv3 y su impacto sobre la excitabilidad; el análisis de esta

subfamilia de subunidades han de conducir al descubrimiento de una nueva clase de canales de K^+ dependientes de voltaje neuronales (Rudy y McBain, 2001).

Un nuevo péptido obtenido del veneno de la anémona marina *Anemonia sulfata*, conocida como Blood-Depressing Substance I y II (BDS I y II; Diochot *et. al.* 1998) fueron recientemente mostrado para bloquear específicamente, reversiblemente y a bajas concentraciones (IC_{50} nanomolar) los canales Kv3.4 (Rudy *et. al.*, 1999). Esta toxina llegó a ser una herramienta importante para investigar el papel de los canales Kv3.4 en tejidos nativos.

Rudy *et. al.*, (1999) mostró que las proteínas Kv3 son expresadas en axones no mielinizados y en terminales presinápticas en el SNC; sus funciones podrían ser relacionados con su habilidad de mantener pequeños potenciales de acción y facilitar la recuperación de procesos que se acumulan durante repetitivos potenciales de acción y pueden limitar la frecuencia de transmisión de dichos potenciales de acción. En sinápsis, para incrementar la repolarización de los potenciales de acción y ayudar a generar pospotenciales hiperpolarizantes rápidos y largos con el incremento en la duración del periodo refractario (Rudy *et. al.*, 1999).

Bloqueo con Tertiapina.

Los canales de potasio rectificadores entrantes dependientes de proteína G (GIRK) son bloqueados por la toxina Tertiapina que también es aislada del veneno de abeja (*Apis mellifera*) como la apamina. Estos canales han sido de interés por diversos investigadores, Ponce *et. al.*, (1996) mediante estudios inmunohistoquímicos localizó la proteína GIRK1 en diferentes regiones del cerebro de rata como el bulbo olfatorio, hipocampo, giro dentado, corteza cerebelar, tálamo, neocorteza entre otras; pero muy poco en los ganglios basales. Lo que sugiere que la proteína GIRK1 está presente en diferentes compartimentos subcelulares depende de los diferentes mecanismos moleculares de la población neuronal.

La FPP que mostró la aplicación de la Tertiapina en la preparación cortico-estriatal de rata en el presente estudio sugiere que los canales GIRK podrían mediar los efectos en la transmisión sináptica tomando lugar en el soma y dendritas de la célula postsináptica (Ponce *et. al*, 1996) donde podrían mediar la inhibición postsináptica. Esta localización en la membrana postsináptica es consistente con su papel como componentes de canales dependientes de ligandos, puesto que en neuronas estos canales han sido acoplados a numerosos receptores de neurotransmisores como la serotonina, histamina, D2 dopamina, GABA_B entre otros (Ponce *et. al*, 1996)

Participación de los canales de potasio en la modulación cortico-estriatal.

La participación de los canales de potasio en la modulación presináptica corticoestriatal se determinó por bloqueadores específicos de estos canales. La aplicación de los bloqueadores al medio extracelular produjo una disminución en la FPP, este fenómeno fisiológicamente indica un aumento en la probabilidad de liberación del neurotransmisor cuando los canales están bloqueados y por lo tanto, nos sugiere que estos canales juegan un papel crítico en la regulación y/o modulación de la liberación del transmisor (Gribkoff *et al*, 2001) en este caso del glutamato.

En la sinápsis cortico-estriatal de la rata, los canales de potasio son importantes debido a que participan en diversas funciones celulares; asimismo están involucrados en distintas patologías propias del cuerpo estriado como la enfermedad de Parkinson, además de la ataxia episódica, la epilepsia neonatal benigna, entre otras (Benatar, 2000).

Los canales de potasio empleados por cada terminal en particular, tienen diferentes cinéticas dependientes y sensitivas. Estos usualmente garantizan la repolarización del potencial de acción, una unión entre la secreción disparada por calcio y el cese de liberación, y en muchos casos, la posibilidad para la frecuencia en la modulación de la liberación del transmisor. El ensamble homo y

heteromultimérico o contener diferentes isoformas de las subunidades α y β para conformar un canal funcional, contribuye a la enorme diversidad de los canales de K^+ observados en el sistema nervioso. Los canales Kv son críticos para una amplia variedad de procesos y juegan un papel esencial en la regulación de la excitabilidad neuronal.

Por otra parte, la distinta localización celular de los canales de K^+ en el cerebro de rata está estrechamente ligada con la función que realiza en la terminal sináptica (Fig. 16).

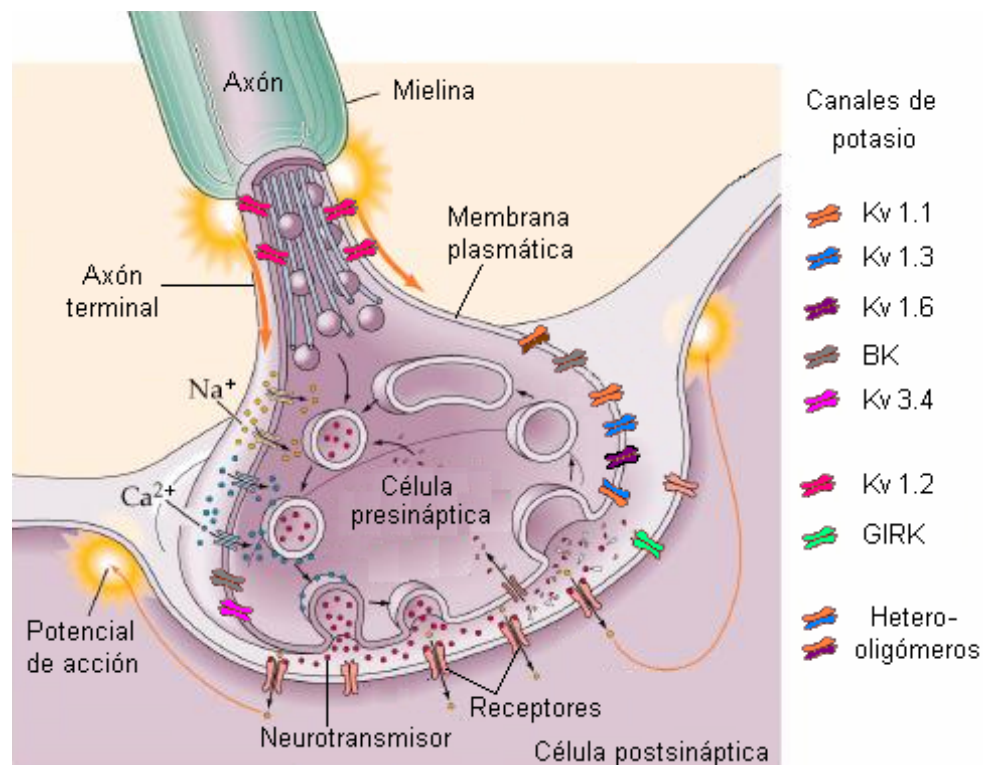


Figura 16. Canales de Potasio presinápticos. Diferentes canales de K^+ identificados en la presinápsis cortico-estriatal de rata mediante el empleo de bloqueadores específicos.

Los canales iónicos son considerados como poros-compuerta cuya apertura y cierre pueden ser intrínsecos o regulados. Los defectos en la función del canal iónico pueden, por lo tanto, tener profundos efectos fisiológicos. Las enfermedades de los canales iónicos (canalopatías) pueden

originarse por diferentes vías como mutaciones o la regulación defectuosa de la actividad del canal debido a que son blancos de un gran y diverso grupo de toxinas que pueden incrementar o inhibir la función del canal. La importancia fisiológica de la actividad de los canales iónicos en este caso los de potasio, es ejemplificado por el hecho de que muchas drogas terapéuticas median sus efectos por la interacción con las proteínas del canal.

Los resultados aportados por el presente trabajo muestran sin lugar a dudas, que los canales de potasio juegan un papel muy importante en la modulación de la liberación de neurotransmisores; lo que abre una amplia gama de posibilidades para el diseño de medicamentos específicos y eficaces que permiten controlar de manera puntual el funcionamiento de los circuitos sinápticos del sistema nervioso cuando se encuentre en un estado patológico.

CONCLUSIONES

- ❖ Los canales de potasio participan en la inhibición presináptica de las aferentes cortico-estriatales de rata.
- ❖ La aplicación extracelular de diferentes bloqueadores de estos canales produjo DPP, es decir aumenta la probabilidad de liberación del neurotransmisor glutamato cuando los canales de potasio permanecen bloqueados.
- ❖ Esta liberación de neurotransmisores de la terminal nerviosa es críticamente dependiente de la duración de potenciales de acción invadiendo la terminal presináptica. Dicha liberación es significativamente elevada al bloquear los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv).
- ❖ Con base a los datos obtenidos y a la farmacología de los canales de potasio se sugiere que al menos tres subfamilias de los canales de la familia Kv1 (Kv 1.1, Kv 1.3 y Kv 1.6) y Kv 3.4 están presentes en la terminal corticostriatal de la rata.
- ❖ El canal Kv1.2 no está presente debido a que no se observó ningún efecto estadísticamente significativo de la Tityustoxina K α (TsTX K α).
- ❖ Los canales de potasio dependientes de Ca²⁺ de gran conductancia (BK) conformados por subunidades α y probablemente por subunidades β 1 estuvieron presentes.
- ❖ La FPP producida por la apamina indican que los canales de potasio dependientes de Ca²⁺ de pequeñas conductancias (SK) juegan un papel indirecto y así estar modulando la liberación del neurotransmisor glutamato en este caso al retrasar la llegada del estímulo nervioso en la sinápsis cortico-estriatal de rata.
- ❖ Los resultados aportados por el presente trabajo muestran que los canales de potasio juegan un papel muy importante en la modulación de la liberación de neurotransmisores, lo que abre una amplia gama de posibilidades para el diseño de medicamentos específicos y eficaces que permiten controlar de manera puntual el funcionamiento de los circuitos sinápticos del sistema nervioso.

LITERATURA CITADA

Allen G. I. y Tsukahara N. 1974. *Cerebrocerebellar communication systems*. *Physiol. Rev.* **54**: 957-1006.

Andrew E. D. y Dudek F. E. 1985. *Spike broadening in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamic slices*. *Brain Res.* **334**: 176-179.

Ashcroft F. M. 2000. *Ion channels and disease*. Academic Press. USA. pp. 97-160.

Barfod E. T., Moore A. L. y Lidofsky S. D. 2001. *Cloning and functional expression of a liver isoform of the small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel SK3*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* **280**: C836–C842.

Bargas J., Ayala G. X., Hernández E. y Galarraga E. 1998. *Ca^{2+} -Channels involved in neostriatal glutamatergic transmission*. *Brain Res. Bull.* **45**: 521-524.

Barral J. 2001. *Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatérgicas al neocórtex de la rata*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM.

Barral J., Poblette F., Mendoza E., Pineda J. C., Galarraga E. y Bargas J. 2001. *High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by ω -agatoxin TK*. *Eur. J. Pharmacology.* **430**: 167-173.

Bear M. F., Connors B.W. y Paradiso M. A. 2001. *Neuroscience: Exploring the Brain*, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, pp 473-482.

Benatar M. 2000. *Neurological potassium channelopathies*. *Q J Med*, **93**: 787-797.

Benishin C. G., Sorensen R. G., Brown W. E., Krueger B. K. y Blaustein M. P. 1988. *Four polypeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat brain synaptosomes*. *Mol. Pharmacol.* **34**:152-159.

Bertrand D. y Changeux J. P. 1995. *Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication*. *Seminars in the Neurosciences.* **7**:75-90.

Bigge C. 1999. *Iontropic Glutamate Receptors*. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 441-447.

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.

Castle N. A., Haylett D. G. y Jenkinson D. H. 1989. *Toxin in the characterization of potassium channels*. *Trends Neurosci* **12** (2): 59-65.

Choe S. 2002. *Potassium channel structures*. *Nature reviews. Neuroscience.* **3**:115-121.

Cheng Y. H., Shin C. M., Kim M. J., Lee B. K. y Cha C. I. 2001. *Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channel subunits in the rat cerebellum*. Brain Research **895**: 173-177.

Coetzee W. A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., MacCormack T., Moreno H., Nadal M. S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E. y Rudy B. 1999. *Molecular diversity of K⁺ channels*. Ann N Y Acad Sci. **868**: 233-285.

Daniel W. W. 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.

Del-Castillo J. y Katz B. 1954a. *Quantal components of the end-plate potential*. J. Physiol. **124**: 560-573.

Del-Castillo J. y Katz B. 1954b. *Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression*. J. Physiol. **124**:574-585.

Diochot S., Schweitz H., Béress L. y Lazdunski M. 1998. *Sea Anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4*. J. Biol. Chem. **273** (12): 6744-6749.

Dodson P. D. y Forsythe I. D. 2004. *Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability*. Trends in Neurosciences. **27**:210-217.

Dodson P. D. Billups B., Rusznák Z., Szűcs G., Barker M. C. y Forsythe I. D. 2003. *Presynaptic rat Kv 1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion*. J Physiol **550**.1:27-33.

Drici M. D., Diochot S., Terrenoire C., Romey G. y Lazdunski M. 2000. *The bee venom peptide tertiapin underlines the role of I_{K_{ACh}} in acetylcholine-induced atrioventricular blocks*. Bri. J. Pharmacol. **131**: 569-577.

Dunwiddie T. V. y Hass, H. L. 1985. *Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action*. J Physiol **369**:365-377.

Eliot L. S., Kandel E. R., Siegelbaum S. A. y Blumenfeld H. 1993. *Imaging terminals of Aplysia sensory neurons demonstrates role of enhanced Ca²⁺ influx in presynaptic facilitation*. Nature. **361**: 634-637.

Engelman H. S. y MacDermott A. B. 2004. *Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release*. Nature Reviews. **5**: 135-145.

Fischer H. S. y Saria A. 1999. *Voltaje-gated, margatoxin-sensitive potassium channels, but not calcium-gated, iberiotoxin-sensitive potassium channels modulate acetylcholine release in rat striatal slices*. Neurosciences Letter. **263** (2-3): 208-210.

García M. L., García-Calvo M., Hidalgo P., Lee A. y MacKinnon R. 1994. *Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from Leiurus quinquestriatus var. hebraeus venom*. *Biochemistry*. **33 (22)**: 6834-9.

García-Calvo M., Leonard R. J., Novick J., Stevens S. P., Schmalhofer W., Kaczorowski G. J. y García M. L. 1993. *Purification, characterization and biosynthesis of margatoxin, a component of Centruroides margaritatus Venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels*. *J. Biol. Chem.* **268 (25)**: 18866-18874.

Galvez A., Gimenez-Gallegos G., Reuben J. P., Roy-Contancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G. J. y Garcia M. L. 1990. *Purification and Characterization of a Unique, Potent, Peptidyl Probe for the High Conductance Calcium-activated Potassium Channel from Venom of the Scorpion Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* **265 (19)**: 11083-11090.

Gao Y. D. y García M. L. 2003. *Interaction of agitoxin2, charybdotoxin and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels*. *Proteins*. **52(2)**: 146-154.

Gribkoff K. V., Starrett E. J. y Dworetzky I. S. 2001. *Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium*. *Neuroscientist* **7 (2)**:166-177.

Grishin E. V., Korolkova Y. V., Kozlov S. A., Lipkin A. V., Nosyreva E. D., Pluzhnikov K. A., Sukhanov S. V y Volkova T. M. 1996. *Structure and function of the potassium channel inhibitor from black scorpion venom*. *Pure & Appl. Chem.* **68**: 2105-2109.

Groenewegen H. J. 2003. *The basal ganglia and motor control*. *Neural Plast.* **10**:107-20.

Harvey A. L. 2001. *Twenty years of dendrotoxins*. *Toxicon* **39**:15-26.

Hammond C. 2001. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2^a ed. Academic Press. San Diego. pp 142-146; 188-214.

Hernández-Echegaray E. 1998. *La modulación colinérgica de las aferentes glutamatérgicas el estriado*. Tesis de Doctorado. UNAM-UACPyP, México.

Hille B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer.

Hopkins W. F. 1998. *Toxin and subunit specificity of blocking affinity of three peptide toxins for heteromultimeric, voltage-gated potassium channels expressed in Xenopus oocytes*. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **285**: 1051-1060.

Hu H., Shao L. R., Chavoshy S., Gu N., Trieb M., Behrens R., Laake P., Pongs O., Knaus H. G., Ottersen O. P. y Store J. F. 2001. *Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release*. *J. Neurosci* **21**: 9585-9597.

Hugues M., Romey G., Duval D., Vincent J. P. y Lazdunski M. 1982a. *Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: Voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor*. Proc. Natl Acad. Sci. USA **79**:1308-1312.

Hugues M., Schmid H., Romey G., Duval D., Frelin C. y Lazdunski M. 1982b. *The Ca^{2+} - dependent slow K^+ conductance in cultured rat muscle cells: characterization with apamin*. The EMBO Journal **9**:1039-1042.

Imredy J. P., Chen C. y MacKinnon R. 1998. *A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1*. Biochemistry. **37 (42)**: 14867-74.

Isaacson J. S. y Walmsley B. 1995. *Counting quanta: direct measurements of transmitter release at a central synapse*. Neuron. **15**:875-884.

Jiang Z.G. y North R.A. 1991. *Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones in vitro*. J. Physiol. Lond. **443**: 533-553.

Jin W., Klem A. M., Lewis J. H. y Lu Z. 1999. *Mechanisms of inward-rectifier K^+ channel inhibition by tertiapin-Q*. Biochemistry. **38 (43)**: 14294-301.

Jones S. P. V. 1997. *Dual modulation of an Inwardly rectifying potassium conductance*. Neuropharmacology **36 (2)**: 209-215

José X. 2005. *Identificación de los canales de potasio presentes en las terminales glutamatérgicas de la sinopsis cortico-estriatal de la rata*. Tesis de Licenciatura. UNAM: FES Iztacala. México. 73 pp.

Kandel E. R., Schwartz J. H. y Jessell T. M. 2000. *Principles of Neural Science*. 4a Ed. McGraw-Hill USA. pp 175-298.

Katoh E., Nishio H., Inui T., Nishiuchi Y., Kimura T., Sakakibara S. y Yamazaki T. 2000. *Structural basis for the biological activity of Dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker*. Biopolymers. **54**: 44-57.

Katz B. y Miledi R. 1968. *The role of calcium in neuromuscular facilitation*. J Physiol. **195**:481- 492.

Katz B. y Miledi R. 1970. *Further study of the role of calcium in synaptic transmission*. J. Physiol. **207**: 789-801.

Kitamura H., Yokoyama M., Akita H., Matsushita K., Kurachi Y. y Yamada M. 2000. *Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K^+ channels in rabbit cardiac myocytes*. J. Pharmacol Exp. Therap. **293**:196-205.

Koschak A., Koch R. O., Liu J., Kaczorowski G. J., Reinhart P. H., García M. L. y Knaus H. G. 1997. *[125I]Iberitoxin-D19Y/Y36F, the first selective, high specific activity*

radioligand for high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry*. **36** (7): 1943-52.

Koschak A., Bugianesi R. M., Mitterdorfer J., Kaczorowski G. J., Garcia M. L. y Knaus H-G. 1998. *Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by Hongotoxin-1, a novel peptide derived from Centruroides limbatus venom*. *J. Biol. Chem.* **273** (5): 2639–2644.

Kubo Y. y Tateyama M. 2005. *Towards a view of functioning dimeric metabotropic receptors*. *Current Opinion in Neurobiology*. **15**:289–295.

Leonard R. J., Garcia M. L., Slaughter R. S. y Reuben J. P. 1992. *Selective blockers of voltage-gated K^+ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 10094-10098.

Legros C., Pollmann V., Knaus H-G., Farrell A. M., Darbon H., Bougisi P, E., Martin-Eauclairei m.-F. y Pongs O. 2000. *Generating a High Affinity Scorpion Toxin Receptor in KcsA-Kvl.3 Chimeric Potassium Channels*. *J. Biol. Chem.* **275** (22): 16918–16924.

López H. S. y Brown, A. M. 1992. *Neuromodulation*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**:317-322.

Luzhkov, V. B. y Åqvist J. 2005. *Ions and blockers in potassium channels: insights from free energy simulations*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1747**: 109-120.

Malenka R. C. y Kocsis J. D. 1988. *Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro*. *J. Neuroscience* **8**: 3750-3756.

Matthews G. G. 2001. *Fisiología celular del nervio y el músculo*. Mc Graw Hill Interamericana. España. 227 pp.

Meera P., Wallner M. y Toro L. 2000. *A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin*. *PNAS*. **97** (10): 5562-5567.

Meir A., Ginsburg S., Butkevich A., Kachalsky S. G., Kaiserman I., Ahdut R., Demirgoren S. y Rahamimoff R. 1999. *Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release*. *Physiol. Rev.* **79**: 1019-1088.

Mennerick S. y Zorumski C. F. 1995. *Paire-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons*. *J Physiol (Lond)* **488**:85-101.

Miller R. J. 1998. *Presynaptic receptors*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:201-227.

Nagayama T., Fukushima Y., Hikichi H., Yoshida M., Suzuki-Kusaba M., Hisa H., Kimura T. y Satoh S. 2000. *Interaction of SK_{Ca} channels and L-type Ca^{2+} channels in catecholamine secretion in the rat adrenal gland*. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol* **279**: R1731–R1736.

- Nicoll R. A., Malenka R. C. y Kauer J. A. 1990. *Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system*. *Physiol Rev.* **70** (2):513-65.
- Nisenbaum E. S., Berger T. W. y Grace A. A. 1992. *Presynaptic modulation by GABAB receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons*. *J Physiol.* **67** (2):477- 481.
- Obermair G. J., Kaufmann W. A., Knaus H. G. y Flucher B. E. 2003. *The small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel SK3 is localized in nerve terminals of excitatory synapses of cultured mouse hippocampal neurons*. *Eur. J. Neurosci.* **17** (4): 721-731.
- Owen D. G., Hall A., Stephens G., Stow J. y Robertson B. 1997. *The relative potencies of dendrotoxins as blockers of the cloned voltage-gated K⁺ channel, mKv1.1 (MK-1), when stably expressed in Chinese hamster ovary cells*. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 1029-1034.
- Peleg S., Varon D., Ivanina T., Dessauer C. W. y Dascal N. 2002. *G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K⁺ channel, GIRK*. *Neuron.* **33**: 87-99.
- Ponce A., Bueno E., Kentros C., Vega-Saenz de Miera E., Chow A., Hillman D., Chen S., Zhu L., Wu M. B., Wu X., Rudy B. y Thornhill W. B. 1996. *G-Protein-Gated Inward Rectifier K⁺ Channel Proteins (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain*. *J. Neuroscience.* **16** (6): 1990-2001.
- Pongs O. 1995. *Regulation of the activity of voltage-gated potassium channels by beta subunits*. *Seminars in the Neuroscience.* **7**:137-146.
- Pongs O. 1999. *Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement*. *Minireview. FEBS Letters* **452**: 31-35.
- Raffaelli G., Saviane C., Mohajerani M. H., Pedarzani P. y Cherubini E. 2004. *BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus*. *J. Physiol.* **557.1**: 147-157.
- Reimann F. y Ashcroft F. 1999. *Inwardly rectifying potassium channels*. *Cell biology.* **11**: 503-508.
- Rodríguez S., C. 2005. *Modulación presináptica de las aferentes glutamatérgicas al neostriado de la rata por la activación de receptores a opiáceos tipo delta. Papel de los canales de potasio*. Tesis de Licenciatura. UNAM: FES Iztacala. México. 73 pp.
- Rogowski R. S., Krueger B. K., Collins J. H. y Blaustein M. P. 1994. *Tityustoxin Ka blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by a-dendrotoxin in synaptosomes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 1475-1479.

Roncarati R., Di Chio M., Sava A., Terstappen G. C. y Fumagalli G. 2001. *Presynaptic localization of the small conductance Calcium-activated potassium channel SK3 at the neuromuscular junction*. Neuroscience **104**:253-262.

Rudy B. y McBain C. J. 2001. *Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing*. Trends in Neurosciences. **24 (9)**: 517-526.

Rudy B., Chow A., Lau D., Amarillo Y., Ozaita A., Saganich M., Moreno H., Nadal M. S., Hernández-Pineda R., Hernández-Cruz A., Erisir A., Leonard C. y Vega-Sáenz de Miera E. 1999. *Contributions of Kv3 Channels to Neuronal Excitability*. Annals New York Academy of Sciences. **868**: 304-343.

Rudy B. 1988. *Diversity and ubiquity of channels*. Neuroscience. **25 (3)**:729-749.

Saria A., Seidl C. V., Fischer H. S., Koch R. O., Telser S., Wanner S. G., Humpel C., García M. L. y Knaus H. G. 1998. *Margatoxin increases dopamine release in rat striatum via voltage-gated K⁺ channels*. Eur. J. Pharmacol. **343 (2-3)**: 193-200.

Schweitz H., Bidard J. N. y Lazdunski M. 1990. *Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (Dendroaspis polylepis) venom*. Toxicon. **28 (7)**: 847-56.

Shepherd G. M. 2004. *The synaptic organization of the brain*. Ed. 5ª ed. Oxford University Press. USA. 719 págs.

Simon A. M y Goudenough D. A. 1998. *Diverse functions of vertebrate gap junctions*. Trends in Cell Biology. **8**: 477-483.

Southan A. P. y Robertson B. 1998. *Modulation of inhibitory post-synaptic currents (IPSCs) in mouse cerebellar Purkinje and basket cells by snake and scorpion toxin K⁺ channel blockers*. Bri. J. Pharmacol. **125**: 1375-1381.

Strøbæk D., Jørgensen T. D., Christophersen P., Ahring P. K. y Olesen S. P. 2000. *Pharmacological characterization of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels stably expressed in HEK 293 cells*. Br. J. Pharm. **129**: 991-999.

Wang F. C., Parcej D. N. y Dolly J. O. 1999a. *α-Subunit compositions of Kv1.1-containing K⁺ channel subtypes fractionated from rat brain using dendrotoxins*. Eur. J. Biochem. **263**: 230-237.

Wang F. C., Bell N., Reid P., Smith L. A., McIntosh P., Robertson B. y Dolly J. O. 1999b. *Identification of residues in dendrotoxin K responsible for its discrimination between neuronal K⁺ channels containing Kv 1.1 and 1.2 α subunits*. Eur. J. Biochem **263**: 222-229.

Wanner S. G., Koch R. O., Koschak A., Trieb M., García M. L., Kaczorowski G. J. y Knaus H. G. 1999. *High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: pharmacology, distribution and subunit composition*. Biochemistry. **38 (17)**: 5392-400.

Werkman T. A., Gustafson T. A., Rogowski R. S., Blaustein M. P. y Rogawski M. A. 1993. *Tityustoxin-Ka, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the α -Dendrotoxin binding site on the cloned Kv 1.2 K⁺ channel.* Mol. Pharmacol. **44**:430-436.

Wilson 2004. The Basal ganglia. En: *The synaptic organization of the brain.* (Shepherd, ed) Ed. 5^a ed. Oxford University Press. USA. 719 págs.

Wu L. G. y Saggau P. 1997. *Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release.* TINS **20** (5):204-212.