



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
°O puto MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**Modificación de los patrones de disparo de  
las neuronas espinosas medianas en los  
ganglios basales de la tortuga por el  
bloqueo de diversas conductancias  
iónicas.**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de

***B I Ó L O G O***

Presenta

**Aarón Guzmán Bello**

ASESOR: *Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero*



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México.  
Mayo 2010.



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 (IN204407, IN213310)**; así como financiamiento otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 81518)**, al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero. Además se contó con una beca por parte del PAPIIT (IN204407) durante el periodo Septiembre 2008 a Junio de 2009

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 Septiembre de 2008 a Abril de 2010.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del

**Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.**

**Proyecto Neurociencias, UIICSE. FES Iztacala, UNAM.**

# Agradecimientos

## A mis Padres

Virginia Bello Balderas y Juan Manuel Guzmán Hernández, por siempre estar conmigo, por ayudarme tanto, por nunca dejar de creer en mí, por sus consejos, por sus regaños, por su paciencia, por todos sus esfuerzos, por todos sus desvelos, por todos sus sacrificios para que yo pudiera estar donde estoy.

Gracias padres por guiar mi camino.

## A mis Hermanos

Pablo, Noé, Larissa y Melisha, por hacer tan feliz mi vida, por hacerme reír, por hacerme enojar, por hacerme llorar, por todo lo que hemos compartido, simplemente por estar ahí siempre, ya que cada día me alientan a seguir y deseo que todas sus metas y sueños se hagan realidad.

Gracias hermanos por reír juntos, por ser quien son.

## A mi Abuelita

Rosa, que más que mi abuela es mi segunda Madre, por siempre estar conmigo, por aguantar todas mis tonterías, por todas las veces que sea desvelado por mi culpa, por apoyarme, por estar siempre que la busco.

Gracias Mamitola por creer en mí.

## A mi Tío y mis Tías

Isaías, Lidia y Angélica, por apoyarme, por alentarme, por jalarme las orejas cuando lo merecía, por nunca dejar de preocuparse por mí.

Gracias Tío y Tías, por ser parte de mí.

## A mis Primitos

Andrés, Gabriela, Iván y Valentina, por contagiarme de su alegría, por que los he visto crecer, por sus risas y chillidos.

Gracias por hacerme reír.

## A mis Amigos

Erik, Isabel, Letí, Laura, Rigo, Val, José Luís, Ulises, Érica, Mireya, Y a todos mis demás compañeros y amigos de la carrera, 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, por todo lo que compartimos, por todas las risas, las prácticas, por todos los festejos, por hacer de la carrera algo que nunca se me va olvidar.

## A mis Compañeros de Laboratorio

Lupita, Vero, Miguel, Salma, Caro, Janeth y Maguí, por su apoyo al hacer este trabajo, por todas las comidas, risas, reclamos y por supuesto, por hacer tan alegre y grata la estancia en el lab.

## ALucero

Por haber compartido conmigo la carrera.

## A mis sinodales de tesis:

Dr. Manuel Arias Montaña

Dra. Bertha Segura Alegría

Dra. Mónica González Isáis

Bíol. Hugo Jesús Castro Cortes

Por dedicarle tiempo a la revisión y asesoramiento del presente trabajo para lograr que se llegara a la culminación de esta etapa.

Al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, por haberme apoyado a lo largo de la realización de este trabajo, por brindarme su tiempo y conocimientos durante la estancia en su laboratorio. Gracias por sus consejos y experiencias que compartió conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.



Y la alegría está en todas partes, está en la verde cubierta de nuestro planeta, en la azul serenidad del cielo, en la temeraria exuberancia de la primavera, en la severa abstinencia del gris invierno, en la carne viva que anima nuestro cuerpo, en el perfecto equilibrio de la figura humana, noble y bien parada, en el vivir, en el ejercitar nuestros poderes, en el aprender, en el luchar... La alegría está en todas partes.

Rabindranath Tagore

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
Potencial de acción	4
Canales Iónicos	5
Canales de potasio	6
Estructura de los canales de potasio	7
Canales 6TM/1P	8
Canales 4TM/2P	10
Canales 2TM/1P	10
Los Ganglios Basales	11
Evolución de los Ganglios Basales	16
Organización funcional y estructural de estriado	20
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>26</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
General	27
Particulares	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
Organismos	28
Disección de Tortuga	29
Sistema de Registro Intracelular	30
Obtención de registros	30
Caracterización electrofisiológica	31
Protocolo Experimental	32
Fármacos	32
Análisis de datos	32
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
Caracterización electrofisiológica	33
Conductancias iónicas	35
Efecto de la 4- aminopiridina	35
Efecto del Tetraetilamonio	37
Efecto de Cesio	39
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
El Efecto de la 4-aminopiridina	43
El efecto del TEA	45
El Efecto de Cesio	47
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

Los diversos canales iónicos de una neurona le proporcionan mecanismos para regular su excitabilidad. Los estímulos producidos por las células, en forma de potenciales de acción (PA), son producidos por el movimiento de iones a través de canales activados por voltaje en la superficie de la membrana. Este movimiento iónico, producido por la apertura de los canales, cambia la distribución de cargas a cada lado de la membrana.

La mayor parte de las neuronas tienen patrones de disparo muy característicos, que permiten su identificación. Una de estas corresponde a las neuronas espinosas medianas (NEM) de los ganglios basales (GB). Los GB se encuentran muy conservados a lo largo de la evolución, sin embargo, se desconocen los aspectos funcionales del circuito estriatal en especies de grupos no-mamíferos; es por este motivo que el estudio comparativo de los GB es de gran importancia, ya que ha revelado varias características que pueden ser de interés para comprender mejor el funcionamiento de estas estructuras. Se ha reportado que las características electrofisiológicas del principal grupo de neuronas de este núcleo, las NEM, están conservadas tanto en aves como en mamíferos. Sin embargo, existen muy pocos registros electrofisiológicos de los GB de amniotas más primitivos, como los reptiles, que arrojen información acerca del funcionamiento de este circuito neuronal.

Por este motivo el presente trabajo tiene por objeto mostrar como el bloqueo de algunas conductancias iónica, principalmente de potasio, que están presentes en las NEM del estriado de la tortuga, modifican el patrón de disparo de estas células y/o las propiedades electrofisiológicas. Ya que el establecimiento de las diferencias, así como las similitudes de las propiedades electrofisiológicas de las NEM, entre mamíferos y reptiles, nos permitiría comprender, entre otras cosas, la forma en que algunas de las funciones motoras reguladas por el estriado pudieran haber evolucionado.

Para ello se obtuvieron registros intracelulares en la modalidad de fijación de corriente en rebanadas de 400  $\mu\text{m}$  del estriado de tortuga (*Trachemys scripta elegans*), con microelectrodos de 80-120  $\text{M}\Omega$  de resistencia. Los protocolos electrofisiológicos que se realizaron fueron de curvas intensidad-voltaje, tanto en condición control como en presencia de bloqueadores inespecíficos de canales de potasio: tetraetilamonio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP) y cesio ( $\text{Cs}^+$ ).

Los efectos observados en las NEM del estriado de tortuga son similares a lo reportado en mamíferos. Entre las características estudiadas en las NEM se observó que la latencia al disparo del PA cambió de  $208 \pm 33.5$  ms, a  $82.8 \pm 20$  ms en presencia de 4-AP (1 mM). Mientras que en presencia de TEA (20 mM) se observó un cambio en la duración del PA de  $5.5 \pm 0.5$  ms a  $129.05 \pm 24.49$  ms, además se observó una rectificación a potenciales hiperpolarizantes, que en presencia de  $\text{Cs}^+$  5 mM fue perdiéndose gradualmente. Los resultados electrofisiológicos arrojados por este trabajo indican la presencia de conductancias iónicas de potasio presentes en la regulación del PA de las NEM del estriado de tortuga, lo que sugiere que las propiedades de disparo de las neuronas estriatales y las conductancias involucradas se encuentra conservadas entre los amniotas.

# INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso tiene como función recibir información del medio ambiente, integrarla y emitir las respuestas correspondientes. Estas operaciones se realizan gracias a la variación en la frecuencia y en el ritmo de aparición de las señales eléctricas neuronales. Muchas de estas señales poseen una amplitud y duración relativamente homogéneas y son conocidas como potenciales de acción, impulsos o espigas de voltaje “todo o nada” (Hodgkin y Huxley, 1952). La frecuencia y el ritmo de disparos de los potenciales de acción pueden correlacionarse con la iniciación, el control y la terminación de la actividad en distintos órganos y tejidos, como son los músculos y las glándulas. De esta manera, el patrón temporal de disparos de los potenciales de acción representa un código mediante el cual una neurona comanda una respuesta determinada. Mediante este mecanismo la información es integrada por la propia neurona y transferida desde el cono axónico hasta las terminales nerviosas, donde ocurre la transmisión sináptica (Shepherd, 2004; Kandel et al., 2000; Hammond 2001).

Los diversos canales iónicos de una célula le proporcionan una gran cantidad de mecanismos para regular su excitabilidad, entendida esta como la forma en que la célula responde, eléctricamente, ante un estímulo dado. Esta regulación puede manifestarse como: latencias variables para disparar, cambios en la duración de los potenciales de acción, cambios en la frecuencia y el ritmo de disparo de las espigas, cambios en la adaptación de la frecuencia de disparo, disparo en ráfagas y presencia de más de un umbral de disparo (Galárraga y Bargas, 1998).

Los patrones de disparo y respuestas excitables que una célula posee se deben a los diversos canales iónicos cuya actividad depende del tiempo, del voltaje

transmembranal y del metabolismo. En términos generales se puede considerar que existen al menos cinco principales familias de conductancias iónicas (Galárraga y Bargas, 1998):

1. **Corrientes salientes persistentes:** corrientes de potasio que repolarizan el potencial de acción y generan el ritmo de disparo en ráfaga, genera la adaptación de frecuencia de disparo.
2. **Corrientes entrantes persistentes** o que se inactivan lentamente: corrientes de sodio que sostienen una determinada frecuencia de disparo por largo tiempo, generan propiedades bi-estables, potenciales despolarizantes lentos; además produce la liberación de neurotransmisores.
3. **Corrientes entrantes transitorias** o que se inactivan rápidamente: corrientes de sodio y de canales de calcio tipo T que generan potenciales de acción “todo o nada” y despolarización transitoria.
4. **Corrientes salientes transitorias** que se inactivan rápidamente: corriente  $I_A$ ,  $I_D$  de potasio que generan latencia prolongada del disparo, baja frecuencia y disparo rítmico.
5. **Rectificadores entrantes** o anómalos: corrientes de canales  $K_{IR}$  y corriente  $I_h$  que mantienen el potencial de membrana en reposo, se opone a la hiperpolarización excesiva, integra las entradas sinápticas de las dendritas.

## Potencial de acción

El potencial de acción se produce por el movimiento de iones a través de canales activados por voltaje en la superficie de la membrana, este movimiento, que ocurre después de la apertura de los canales, cambia la distribución de cargas a cada lado de la membrana (Kandel et al., 2000).

Los mecanismos por los cuales se genera un potencial de acción del tipo “todo o nada” varían en las diferentes células excitables, sin embargo, el mecanismo general es el mismo:

- A) Un estímulo adecuado produce un cambio en el potencial de membrana de la célula estimulada, este cambio consiste en una despolarización.
- B) Cuando la despolarización alcanza una magnitud determinada (umbral de disparo) se abren canales que conducen corriente catiónica entrante (principalmente conductancias de sodio rápidas) que despolarizan aún más la membrana produciendo un potencial de acción “todo o nada”.
- C) Poco tiempo después de que los canales de sodio han sido abiertos, éstos se cierran mediante el proceso de inactivación; simultáneamente se activan canales que conducen corriente saliente (principalmente canales de potasio retardados).
- D) Con la inactivación de los canales de corriente entrante y la apertura de los canales de corriente saliente termina la despolarización y la membrana se repolariza; llegando a alcanzar incluso valores menores del potencial de membrana que los que se tenían en el reposo (pospotencial hiperpolarizante).

Es fácil comprender entonces, que los diversos canales iónicos de una célula le proporcionan un repertorio de mecanismos para regular su excitabilidad.

## **Canales iónicos**

Los canales iónicos de las neuronas están afinados de forma óptima para el procesamiento rápido de la información; estos canales son heterogéneos, de forma que diferentes canales en distintas zonas del sistema nervioso pueden llevar a cabo tareas específicas de transmisión de señales. Los canales iónicos poseen propiedades importantes: conducen, reconocen y seleccionan iones específicos, y se abren y cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas específicas (Kandel et al., 2000).

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que regulan el flujo de iones a través de esta en todas las células (Hille, 2001). Se activan por el cambio en el potencial de membrana, y participan en un gran número de funciones celulares importantes, ya que son reguladores cruciales de la excitabilidad neuronal y del potencial de la membrana, entre ellos destacan los canales de potasio (Dodson y Forsythe, 2004).

## **Canales de potasio**

De los canales iónicos presentes en las membranas celulares, los canales de  $K^+$  son de gran importancia, pues permiten el flujo de potasio y son esenciales para la generación de la corriente eléctrica a través de las membranas (Choe, 2002). Son reguladores fundamentales de la excitabilidad ya que coloca al potencial de membrana en el reposo y lo puede acercar al umbral de disparo, repolariza potenciales de acción y limita la excitabilidad (Dodson y Forsythe, 2004). Además, controlan la frecuencia y la forma del potencial de acción, la secreción de hormonas y de neurotransmisores y el potencial de membrana de la célula. Sus actividades son reguladas por un número de factores que incluyen los potenciales a través de la

membrana celular, calcio citosólico y ATP, la acción de varias cinasas y fosfatasas de proteínas, y segundos mensajeros movilizados por neurotransmisores y hormonas (Miller, 1995; Alexander et al., 2004).

Durante la década pasada, los canales de  $K^+$  han sido clonados, con lo que se ha podido establecer sus propiedades específicas como: la estequiometría de las subunidades, ensamblaje y modulación por segundos mensajeros (Char-Chang, 2000), utilizando agentes bloqueadores permeables a la membrana celular y bloqueando la conducción de los canales (Kaczorowski y García, 1999), o disminuyendo la selectividad al ión. Por otro lado se han realizado estudios de mutagénesis dirigida en donde se puede ver como es la actividad de los canales cuando se alteran algunos de los genes que codifican para un canal en particular (Jarolimek et al., 1998).

En la actualidad se conocen más de 100 genes que codifican para las diferentes familias de los canales de potasio (Phil et al., 2000). Estos canales se encuentran tanto en eucariontes como en procariontes y constituyen un factor central para la vida celular (Hille, 2001). En organismos superiores los canales de potasio se han convertido en factores primarios del señalamiento intracelular, particularmente entre las neuronas (Choe, 2002; Char-Chang, 2000).

### **Estructura de los canales de potasio**

Los canales de potasio están constituido por una diversa familia de proteínas de membrana (Char-Chang, 2000; Gribkoff et al., 2001), altamente conservados a través de los diferentes grupos filogenéticos (Gribkoff et al., 2001). Estos canales están formados por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$  (Phil, et al., 2000), la subunidad responsable de la selectividad del ión es la subunidad alfa, se encuentra integrada a la

bicapa lipídica. La subunidad alfa tiene una región muy estrecha formada por aminoácidos, llamada “región del poro” o simplemente región P (Smith-Nielsen, 1997; Nicholls y Lopatin, 1997; Cingolani y Houssay, 1998; Choe, 2002). Esta subunidad se encuentra altamente conservada, ya que es la formadora del filtro de selectividad para los iones potasio (Hille, 2001).

Estos canales generalmente actúan hiperpolarizando a las neuronas por medio de su apertura, permitiendo el flujo de  $K^+$  hacia fuera de la célula a favor de su gradiente de concentración (Gribkoff et al., 2001).

Existen varias clases de canales de potasio (Phil et al., 2000), comúnmente están divididos en cuatro clases estructurales, basándose en el número de dominios transmembranales y regiones del poro. Las cuatro clases están constituidas por: A) 6 dominios transmembranales con una región del poro; B) 2 dominios transmembranales con una región del poro; C) 4 dominios transmembranales con 2 regiones del poro; y D) 8 dominios transmembranales con 2 regiones del poro. Estos se pueden dividir en familias dependiendo de sus propiedades biofísicas o en subfamilias dependiendo de la homología de las secuencias (Gribkoff et al., 2001).

### **Canales 6TM/1P**

Son una familia de proteínas de membrana que están muy relacionadas y que difieren en su desarrollo de apertura, conductancias y farmacología. Su inactivación está en el rango de los milisegundos a segundos y los canales de potasio con diferentes propiedades de inactivación tienen un efecto diferente en la integración de la señal y en las propiedades del disparo repetitivo de la neurona (Choi et al., 1991).

A esta familia corresponden los canales de potasio que se abren por cambios en el voltaje transmembranal, conocidos como canales  $K_v$ , que tienen 6 segmentos

transmembranales (6TM) y una región P (1P), son comúnmente conocidos como canales 6TM/1P. En esta categoría se incluye a los canales de  $K^+$  dependientes de calcio, los cuales presentan una hélice adicional (llamada S0), localizada en el extremo amino terminal del segmento transmembranal 1 (S1), la cual queda en el lado extracelular de la membrana. Estos canales participan en el control de la excitabilidad eléctrica celular (Meir et al., 1999). Esta familia incluye a los canales de  $K^+$  denominados como “Shaker” y “Herg”, así como los canales de  $K^+$  activados por calcio y los canales KCNQ, activados por la despolarización (Char- Chang et al., 2000).

Los canales pertenecientes a esta clase tienen importantes características como:

1. Canales dependientes de calcio: se pueden encontrar en neuronas a través del sistema nervioso de los vertebrados. Se activan por las concentraciones internas de calcio, o por el calcio interno y la despolarización, son llamadas conductancias pequeñas activadas por calcio (SK) y conductancias grandes (BK), respectivamente (Meir et al., 1999). Los canales SK juegan un papel fundamental en todas las células excitables, ya que son canales independientes de voltaje. Son activados por un incremento en el nivel de calcio intracelular, como ocurre durante un potencial de acción. Su activación causa hiperpolarización de la membrana, la cual inhibe el disparo celular y limita la frecuencia de disparo de los potenciales de acción repetitivos. La fase inicial del potencial de acción está dada por la activación de los canales BK, mientras que la fase lenta está dada por los SK, los cuales son abiertos solamente por iones calcio intracelularmente (Bond et al., 1999). Los canales BK, son canales dependientes de voltaje, su apertura es controlada por el voltaje transmembranal. Son altamente dependientes de la concentración intracelular de calcio, limitando la excitabilidad neuronal.

2. Los canales dependientes de voltaje se encuentran altamente distribuidos en las neuronas. El papel de estos canales es el controlar el potencial de reposo de la membrana (Tan y Llano, 1999). Las corrientes de potasio activadas por voltaje que se encuentran en las terminales nerviosas pueden ser moduladas sinápticamente por varias moléculas y drogas.

### **Canales 4TM/2P**

Otra de las familias de canales de potasio que contiene 4 dominios transmembranales y dos regiones P (4TM/2P) se conocen como "leak", o canales de corriente de fuga (Phil et al., 2000), intervienen en el mantenimiento del potencial de la membrana (Meir et al., 1999). Representan la familia de canales de  $K^+$  más abundante, con más de 50 tipos diferentes. (Char-Chang et al., 2000).

### **Canales 2TM/1P**

Quizás la familia de canales de potasio con la estructura más sencilla, en cuanto a su arquitectura, se encuentra en la familia de los canales de potasio rectificadores anómalos o entrantes ( $K_{IR}$ ), estos canales están formados por 2 hélices transmembranales (2TM) y una región del poro entre ellos (Char-Chang et al., 2000), de allí a que algunas veces se les llame como 2TM/1P (Phil et al., 2000). Estos canales conducen las corrientes de  $K^+$  en dirección saliente (Char-Chang et al., 2000), por ello son importantes en el restablecimiento del potencial de la membrana durante el reposo. Estos canales son muy importantes en la regulación de la secreción de la insulina, la respuesta a la isquemia cardiaca y cerebral, además, de que participan en el control del tono muscular vascular (Reimann y Ashcroft, 1999; Phil et al., 2000).

Los canales  $K_{IR}$  cumplen dos funciones principales en la célula: establecen el potencial de membrana en el reposo a valores cercanos al potencial de equilibrio para

el  $K^+$  y median el transporte de  $K^+$  a través de la membrana (Jones, 1997; Reiman y Ashcroft, 1999). Estos canales conducen más corriente cuando el potencial de la membrana está hiperpolarizado que cuando está despolarizado. Esta propiedad resulta principalmente de su dependencia al voltaje bloqueando las corrientes salientes por cationes citoplásmicos ( $Mg^{2+}$  y poliaminas), que entran al poro por la influencia del campo de voltaje de la membrana e impiden el influjo de potasio. Estos cationes interactúan con residuos de cargas negativas del 2TM y/o con el extremo carboxilo terminal para inducir la rectificación entrante (Reiman y Ashcroft, 1999).

## **Los Ganglios Basales**

Los ganglios basales (GB) son estructuras subcorticales altamente interconectadas entre si que juegan un papel muy importante en las funciones motoras, particularmente en la iniciación, planeación y ejecución de los movimientos (Albin et al., 1989; Wilson, 2004). También se ha aceptado que están relacionadas con funciones no motoras como conductas incentivas y de motivación (Redgrave et al., 1999).

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

El cuerpo estriado en particular, y en general los ganglios basales, son algunas de las estructuras mejor estudiadas del sistema nervioso de los mamíferos, ya que la degeneración de estos núcleos está relacionada con la alteración de movimientos voluntarios, presentes en algunas enfermedades altamente incapacitantes como son:

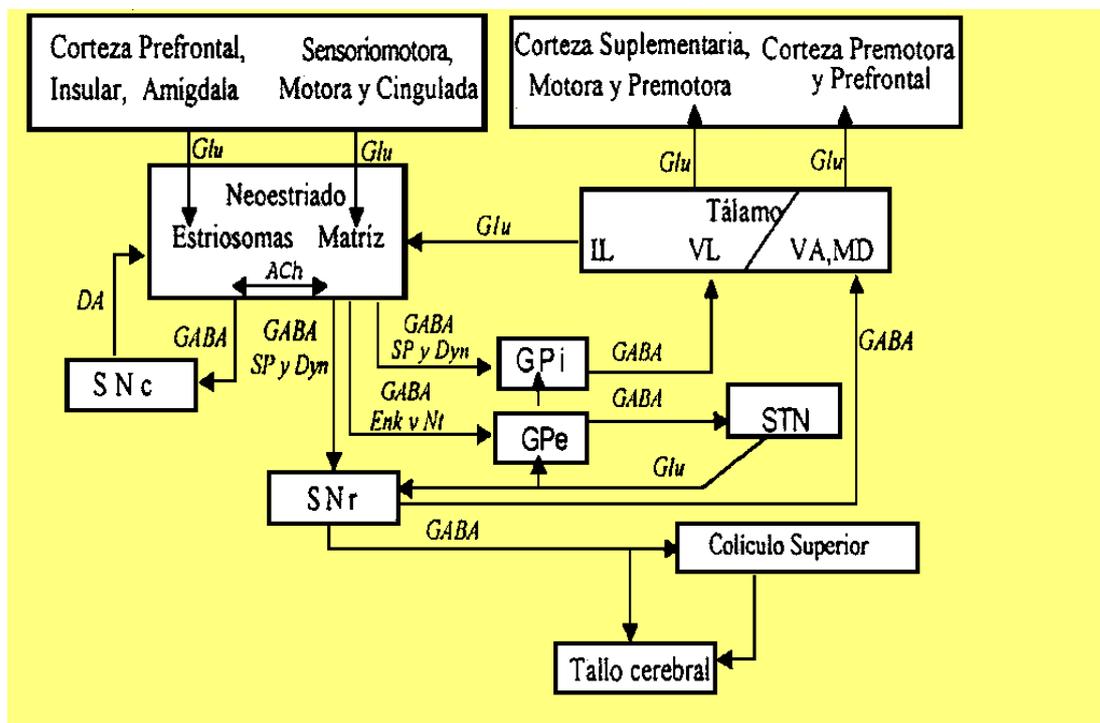
la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourett, las discinesias y la corea de Huntington, entre otras. Debido a esta relevancia clínica han sido objeto de numerosas investigaciones en las últimas décadas (Lovinger y Tyler, 1996; Lange et al., 1997; Wilson, 1998). Se considera además, que los ganglios basales se encuentran muy conservados a lo largo de la evolución, ya que el circuito sináptico que lo forma prácticamente no ha cambiado desde los peces hasta los mamíferos (Marín et al., 1998; Reiner et al., 1998).

Se considera que los ganglios basales están organizados en dos sistemas principales: A) el *sistema dorsal estriato-palidal*, que consta del estriado dorsal (núcleos caudado y putamen en primates) y pálido dorsal, el cual se divide en dos componentes, globo pálido externo (en primates) o simplemente globo pálido (en no-primates) y en globo pálido interno (en primates) o núcleo entopeduncular (no-primates); y B) el *sistema estriatopalidal ventral*, que está constituido por el estriado ventral (núcleo accumbens y parte del tubérculo olfatorio) y el pálido ventral (Marín et al., 1998; Medina y Reiner, 1995,1997).

En mamíferos y saurópsidos (aves y reptiles), los GB poseen una porción dorsal relacionada con las funciones sensorio-motoras, mientras que la porción ventral está involucrada en las respuestas emotivas (Marín et al., 1998). En todos los amniotas, los GB están localizados en la porción central y/o ventral del telencéfalo debajo de la corteza o palium, y separada de ella por una lámina fibrosa libre de células que se conoce como “cuerpo calloso” en los mamíferos, o lámina medular dorsal en las aves (Reiner et al., 1998). Estos núcleos reciben su entrada primaria desde la corteza cerebral y envían su información hacia el cerebro medio, y vía tálamo, ésta regresa a las cortezas prefrontal, premotora y motora. De este modo, las

funciones motoras de los GB son por lo tanto mediadas, en gran parte, por las áreas motoras de la corteza frontal (Fig. 1) (Kandel et al., 2000).

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



**Figura 1. Circuito sináptico en los ganglios basales (GB).** Compartimentalización de la entrada cortical hacia el núcleo estriado tal como se observa en los mamíferos actuales. Las células de proyección de los estriosomas proyectan hacia la sustancia nigra pars compacta (SNc) y reciben aferentes de ella. Las neuronas espinosas medianas de la matriz proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulada (SNr) y al globo pálido interno (GPi) y externo (GPe). El GPi proyecta hacia el tálamo ventral lateral, y este a su vez envía terminales a regiones motoras de la corteza. El GPe mantiene proyecciones recíprocas con el núcleo subtalámico (STN), quien a su vez proyectan a la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior (VA) y dorsomedial (MD). Estos núcleos proyectan hacia las regiones límbicas de la corteza. Asimismo en el diagrama se muestran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías: acetilcolina (ACh), dopamina (DA), dinorfina (Dyn), encefalinas (Enk), glutamato (Glu), ácido-gama-aminobutírico (GABA), neurotensina (Nt) y sustancia-P (SP). (Tomado de Barral et al., 2001).

- A) Núcleos caudado-putamen: estos núcleos comparten la misma organización celular, por lo que comúnmente son considerados como uno sólo, el estriado, al cual llegan las aferencias glutamatérgicas provenientes de todas las áreas de la corteza cerebral, así como de los núcleos intralaminares del tálamo. La entrada de información cortical al estriado permite dividir a éste último en dos regiones, una sensorio-motora y una asociativa. La primera se localiza principalmente en el putamen y recibe proyecciones de la corteza motora. Por otro lado, la región asociativa, principalmente localizada en el caudado, recibe proyecciones de las cortezas frontales, parietales, temporales y occipitales (Flaherty y Graybiel, 1991).
- B) Núcleo accumbens: este núcleo comparte con el estriado la misma citoarquitectura. Sin embargo, las vías glutamatérgicas que llegan a él provienen principalmente del hipocampo y de la corteza límbica, mientras que su entrada dopaminérgica proviene del área ventral tegmental (AVT). Los núcleos caudado, putamen y accumbens, considerados conjuntamente constituyen el neostriado (Wilson, 1998).
- C) Núcleo subtalámico: esta estructura es comúnmente considerada como el núcleo de relevo de la salida de información neostriatal, sin embargo también se ha demostrado anatómicamente y fisiológicamente su conectividad con la corteza (en especial con las regiones motoras del lóbulo frontal) y el tálamo (Magill et al., 2000).

El estriado es el principal núcleo de entrada de información a los GB, que recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo (Wilson, 2004; Smeets et al., 1999). La mayor parte de las neuronas del estriado son neuronas de proyección, es decir, sus axones salen de este núcleo y establecen sinapsis fuera de él. Por su tamaño y la presencia de espinas dendríticas estas células reciben el nombre de

neuronas espinosas medianas (NEM), se trata de neuronas GABAérgicas ya que liberan el ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor (Wilson, 2004).

El estudio comparativo de los ganglios basales es de gran importancia ya que ha revelado varias características que pueden ser de interés para comprender mejor el funcionamiento o la disfunción de estas estructuras. Sin embargo, todos estos estudios son altamente especulativos cuando sólo integran datos anatómicos (Reiner et al., 1998). Los neurotransmisores y neuromoduladores implicados en el circuito sináptico estriatal también están presentes en amniotas y anamniotas (Reiner et al., 1998). En ese sentido, se conoce que conexiones neuronales como las dopaminérgicas son de gran importancia en este núcleo, ya que están involucradas en el control motor; aunque se desconoce si este circuito ha cambiado funcionalmente a través de la evolución; por otro lado se considera que el origen ontogenético de esta población de neuronas es la misma en amniotas y anamniotas (Marín et al., 1998). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los aspectos funcionales del circuito estriatal en la gran mayoría de las especies de grupos diferentes a mamíferos.

Existen evidencias sobre las propiedades electrofisiológicas del principal grupo de neuronas de este núcleo (neuronas espinosas medianas o NEM) que reportan que estas neuronas se encuentran conservadas tanto en aves como en mamíferos (Sugimori et al., 1978; Pineda et al., 1992; Flores-Hernández et al., 1994; Nisenbaum et al., 1994; Hernández-López et al., 1997; Reyes et al., 1998; Luo y Perkel, 1999; Farries y Perkel, 2000; 2002; Ding y Perkel, 2002; Perkel et al., 2002; Farries et al., 2005). En ese sentido se ha reportado que el estriado de las aves tiene neuronas con características electrofisiológicas muy parecidas a las presentes en el estriado de mamíferos, aunque por otra parte también se ha reportado la presencia de neuronas no descritas para el estriado de mamíferos, y estas fueron halladas en una parte del

estriado, denominada porción “X” que se sabe está relacionada con el aprendizaje del canto (Ding y Perkel, 2002; Farries y Perkel, 2000; 2002; Perkel et al., 2002; Luo y Perkel, 1999; Kröner et al., 2002).

Se sabe que tanto aves y mamíferos provienen filogenéticamente de diversos grupos de reptiles. Sin embargo los estudios sobre aspectos funcionales de estructuras nerviosas en este grupo son muy escasos. Así por ejemplo podemos mencionar que los estudios en reptiles se han realizado principalmente en tortugas, donde existen numerosos reportes que incorporan registros electrofisiológicos, realizados en diferentes núcleos del sistema nervioso: corteza cerebral (Shen y Kriegstein, 1986; Blanton et al., 1989,1990 y 1991), cerebelo (Gabbiani et al., 1994), sistema visual (Vitanova et al., 2001; Bartol et al., 2002 y Louis et al., 2002), núcleo rojo (Keifer et al., 1992), tallo cerebral (Kiehn et al., 1992), médula espinal (Delgado-Lezama et al., 1999; Hounsgaard, 2002; McDonagh et al., 1999; Perrier y Hounsgaard, 1999; Guertin y Hounsgaard, 1998; 1999; Henselmans et al., 1991). No obstante, los únicos reportes en la bibliografía sobre aspectos electrofisiológicos de los ganglios basales de reptiles que arrojen información acerca del funcionamiento de este circuito neuronal tan importante para el control motor han sido producido por nuestro laboratorio (Sánchez-Mejorada et al., 2009; Barral et al., 2010).

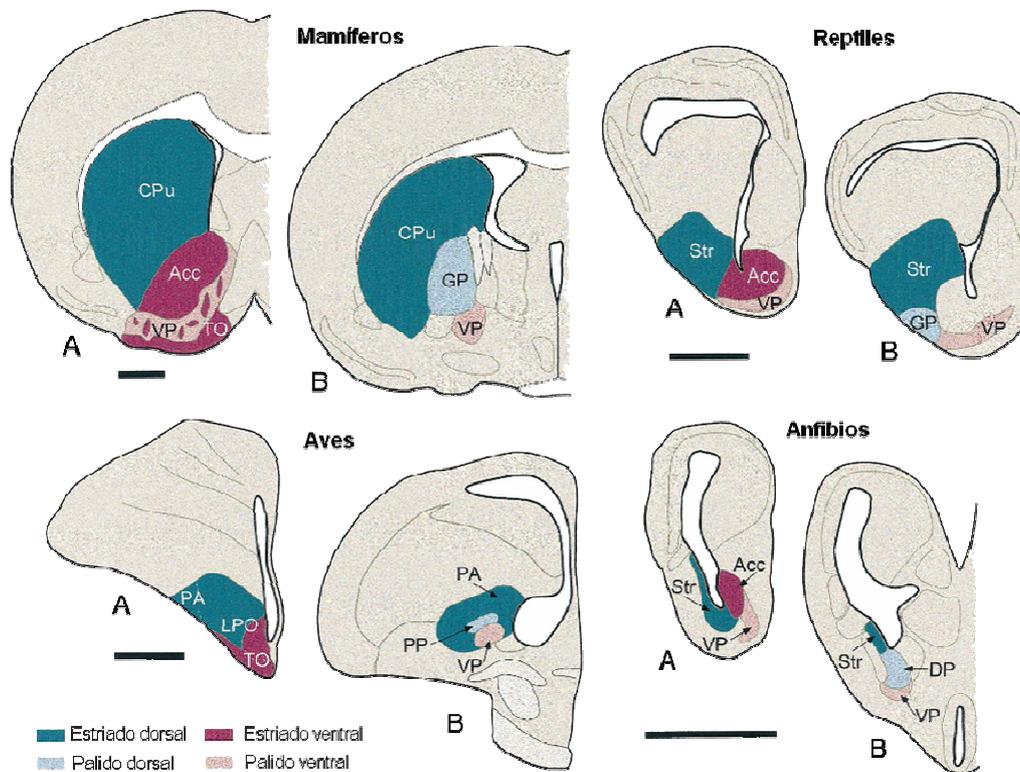
## **Evolución de los Ganglios Basales**

Los ganglios basales parecen tener una mayor evolución durante la transición de anfibios a reptiles, esta elaboración pudo haber permitido a los amniotas aprender y ejecutar una mayor cantidad de comportamientos y movimientos, habilidades que probablemente fueron un elemento importante para su adaptación al medio terrestre. Las subdivisiones estriatales y palidales están claramente presentes en los anamniotas (Fig. 2) y la mayor influencia de los ganglios basales sobre las funciones

motoras de los anamniotas parece ser ejercida vía un circuito de salida hacia el tectum. Por el contrario, en los amniotas modernos las partes estriatales y palidales de los ganglios basales (Fig.2) contienen la misma población básica de neuronas, y el circuito funcional también parece ser muy similar en todos los amniotas, siendo su principal influencia sobre las funciones motoras por un circuito de salida hacia la corteza cerebral y tectum (Reiner et al., 1998).

Se piensa que la evolución de los GB en los mamíferos ha seguido una evolución divergente al patrón observado en las aves y reptiles. En estos últimos el estriado se hipertrofia mientras el primordio cortical permanece inalterado (Reiner et al., 1984). El patrón observado en mamíferos muestra que los ganglios basales permanecen relativamente sin cambios. Sin embargo, el primordio cortical sufre una gran hipertrofia formando la típica neocorteza que rodea a los ganglios basales (Reiner et al., 1998). De esta manera, el telencéfalo de los saurópsidos (aves y reptiles) está dominado por los ganglios basales, mientras que el telencéfalo de los mamíferos está dominado por la neocorteza (Reiner et al., 1984). En los mamíferos, el palium de los anfibios que cubre a los GB se convierte en la corteza de seis capas característica, mientras que en las aves se desarrolla una corteza especial para funciones viso-espaciales denominada como el Wulst. En los reptiles, parte de este tejido palial forma la cresta ventricular dorsal (DVR), y una corteza de tres capas también característica (Butler y Hodos, 2005; Reiner et al., 1998).

Inicialmente se pensó que la DVR formaba parte de los GB, debido a las similitudes citoarquitectónicas. Sin embargo, sobre la base de estudios embriológicos, anatómicos, histológicos y funcionales, se ha establecido que la DVR es más similar a la corteza de los mamíferos, siendo funcionalmente análoga (Reiner et al., 1983; Reiner et al., 1984).



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

Por otro lado, se ha sugerido que la evolución de los ganglios basales se ha llevado a cabo en diversas etapas a lo largo de la evolución de los vertebrados, ya que en los primeros vertebrados (presumiblemente los peces agnatos) los hemisferios cerebrales consistían solamente de componentes olfatorios. Así, en los vertebrados

más primitivos el precursor de los ganglios basales recibía estímulos olfatorios, aferencia que va disminuyendo en importancia en los vertebrados más evolucionados y es insignificante en el hombre (Northcutt, 1981; Marín et al., 1998; Reiner et al., 1998). Posteriormente la subdivisión palidal de los ganglios basales aparece durante la evolución de peces mandibulados, seguida por la aparición de una subdivisión estriatal en el linaje de los anfibios. En los primeros reptiles (ahora extintos) se piensa que ocurrieron dos hechos importantes: a) el estriado alcanza ya proporciones relativas similares a las que se observan en los mamíferos; y b) los precursores de la corteza aparecen en el techo de los hemisferios cerebrales (Reiner et al., 1984).

Estudios recientes acerca de las conexiones, quimioarquitectura, distribución de marcadores bioquímicos (tales como dopamina, sustancia P y encefalinas), así como la expresión de genes homeóticos de las estructuras palidales y estriatales de los ganglios basales han revelado que los vertebrados tetrápodos tienen patrones comunes de organización en sus ganglios basales (Smeets et al., 1999). Este tipo de estudios muestran que algunas características están presentes en todos los amniotas: 1) la presencia de un sistema estriato-palidal dorsal y ventral; 2) la presencia de dos tipos de poblaciones de neuronas estriatales de proyección químicamente diferentes; 3) neuronas estriatales intrínsecas; 4) una fuerte entrada dopaminérgica originada del tegmento del cerebro medio; 5) conexiones corticoestriatales y tálamo-estriatales; 6) proyecciones estriatales y palidales hacia la región tegmental del cerebro medio; y 7) proyecciones de los ganglios basales hacia los centros premotores mesencefálicos e ístmicos. Estas similitudes han llevado a la conclusión de que esta organización probablemente ya estaba presente en los antepasados de los amniotas (Marín et al., 1998; Smeets et al., 1999 y Reiner et al., 1998). Por todo lo anterior se ha sugerido que el desarrollo de los ganglios basales como lo observamos en los organismos

actuales se llevó a cabo en la transición evolutiva de anamniotas a amniotas (Marin et al., 1998; Reiner et al., 1998).

Por otro lado, se ha reportado que los ganglios basales de los amniotas contienen subpoblaciones similares de neuronas, identificadas a través de técnicas inmunohistoquímicas y los transmisores presentes en ellas, lo que sugiere que la evolución de los ganglios basales está altamente conservada y que estas estructuras juegan un papel motor similar en los amniotas. Sin embargo, los ganglios basales de aves y reptiles parecen diferir de los GB de los mamíferos en que los primeros tienen una mayor influencia sobre las funciones motoras a través de una salida hacia el tectum vía pretectum, mientras que en los mamíferos es por una salida hacia la corteza motora vía tálamo (Reiner et al., 1984). Aunque las conexiones y los transmisores neuronales en los GB de los amniotas parecen estar conservados, las diferencias sustanciales entre las células de estos organismos radican en el número y localización (Smeets et al., 1999).

### **Organización funcional y estructural del estriado**

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

Se ha reportado que el cuerpo estriado de las aves no es enteramente homólogo al estriado de los mamíferos, ya que esta estructura aviar incorpora algo de

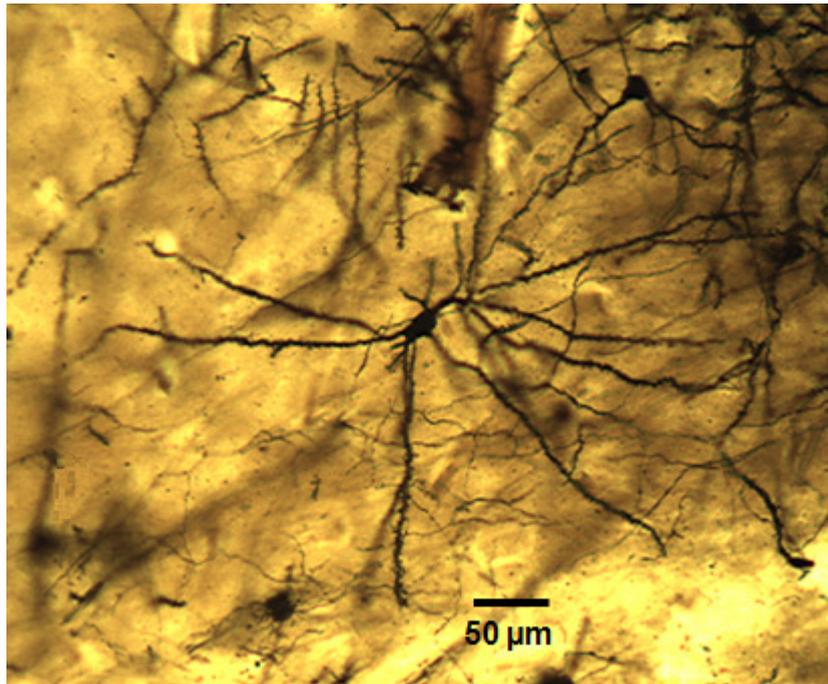
la neocorteza primitiva de los reptiles, denominándose como el estriado dorso lateral (EDL) y el lóbulo paraolfatorio (LPO) equivalentes al estriado de la rata (Farries y Perkel, 2000; 2002; Farries et al., 2005). Aunque la organización telencefálica varía considerablemente entre los grupos de reptiles, el telencéfalo de todos los reptiles es caracterizado por un engrosamiento de la pared telencefálica lateral, la cual sobresale dentro del ventrículo lateral y es generalmente referido como la cresta ventricular anterior-dorsal (ADVR) de los reptiles. Muchos investigadores han considerado a la ADVR como la estructura homóloga del neoestriado y el hiperestriado ventral de aves. En los mamíferos el estriado es considerado como probable candidato para ser la estructura homóloga de la ADVR de reptiles, ya que esta estructura (el estriado) es la única cresta intraventricular prominente dentro del telencéfalo de mamíferos (Striedter, 1997).

Dentro del cuerpo estriado en los ganglios basales, las entradas glutamatérgicas desde las áreas corticales sensoriales, motoras y de asociación convergen con entradas, también glutamatérgicas, provenientes del núcleo intralaminar talámico, con entradas dopaminérgicas desde la sustancia nigra pars compacta, y con entradas serotoninérgicas desde el núcleo Rafé dorsal (Wilson, 1998).

La mayor parte de las neuronas del estriado son neuronas de proyección, conocidas con el nombre de neuronas espinosas medianas (NEM) (Fig. 3). En primates y roedores las NEM constituyen el 97 % y el 95 % de la población de neuronas estriatales respectivamente. Estas neuronas presentan un soma de 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen un árbol dendrítico que ocupa un área con un diámetro aproximado de 300-500  $\mu\text{m}$ , el cual emite varias colaterales que arborizan profusamente (Bennett y Wilson, 2000).

Las NEM poseen potenciales en reposo de alrededor de  $\approx -85$  mV, por lo que para generar potenciales de acción requieren de una gran excitación. La activación de receptores glutamatérgicos tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propionato) y NMDA (N-metil-D-aspartato), mantienen el potencial de membrana de las NEM a -55 mV aproximadamente, haciendo más eficaces las entradas excitatorias por tiempos más prolongados. Dentro de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de estas neuronas se encuentra la presencia de conductancias rectificadoras de potasio: una corriente rectificadora entrante o anómala ( $I_{K_{ir}}$ ), la cual se activa a potenciales hiperpolarizados (alrededor de -80 mV) e impide que el potencial de la membrana se haga más negativo y una corriente rectificadora entrante (principalmente  $I_A$ ) activada a partir de -60 mV, que estaciona el potencial de membrana en valores subumbrales o impide que se haga más positivo (Galarraga et al., 1994), esta conductancia, sensible a 4-aminopiridina (4-AP), produce una rampa y el retraso de la espiga en respuesta a pulsos de corriente despolarizante (Farries y Perkel, 2000; Venance y Glowinski, 2003; Nisenbaum y Wilson, 1995).

---



**Figura 3. Fotomicrografía de una neurona espinosa mediana del estriado de la tortuga.** Se puede observar el soma ovoide o fusiforme de 22  $\mu\text{m}$  de diámetro, del que parten 4 a 5 ramas dendríticas profusamente cubiertas por espinas dendríticas que forman un árbol dendrítico de aproximadamente 350  $\mu\text{m}$ . Micrografía obtenida en el laboratorio con la técnica de Golgi.

---

La activación de estas dos conductancias disminuye la resistencia de entrada de la NEM, este efecto se refleja como una disminución en la pendiente de la función corriente voltaje, en el rango de voltaje en la que cada una está activa (Galarraga et al., 1994). Asimismo, se ha reportado para las NEM de mamífero un umbral de disparo entre -55 a -45 mV y una amplitud de la espiga de 60 mV (Venance y Glowinski, 2003).

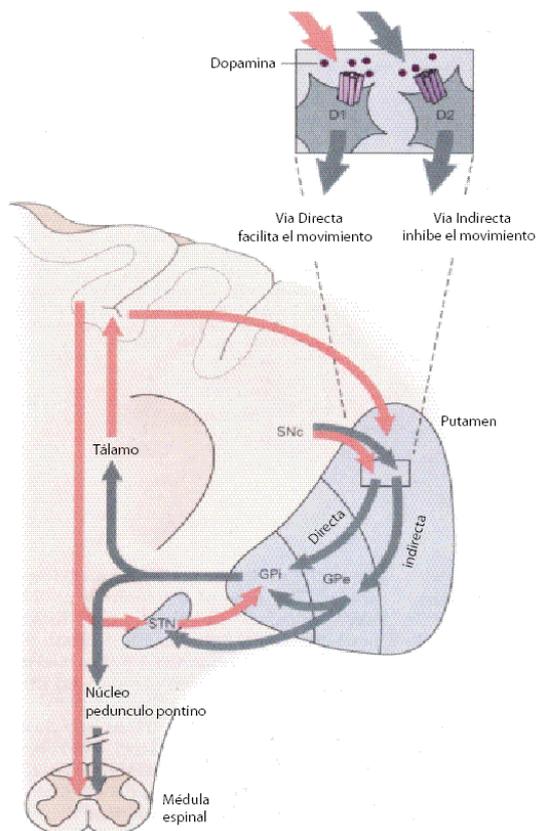
En todos los amniotas, la parte estriatal de los ganglios basales es rica en acetilcolinesterasa (AChE) y colin-acetiltransferasa (ChAT), así como sustancia-P (SP), encefalinas (ENK) y dopamina (DA) (Reiner et al., 1998).

Sin embargo, las diferentes estirpes celulares no parecen estar distribuidas uniformemente en el estriado de todos los amniotas. Al menos en mamíferos, el estriado medial está organizado en dos tipos de compartimientos distinguibles neuroquímicamente y morfológicamente, los parches o estriosomas y la matriz o matriosomas. Sin embargo, esto no ha sido demostrado para los saurópsidos, por lo

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

Dentro de esta compartimentalización del estriado en los mamíferos el estrioso recibe su mayor entrada de la corteza límbica y proyecta primariamente hacia la sustancia nigra pars compacta (SNc) y contiene sustancia P, dinorfina y encefalinas. Las NEM de este compartimiento expresan receptores  $\mu$ -opioides (MOR), mientras que las NEM de la matriz no lo expresan (Gerfen, 1992). Las NEM de la matriz pueden formar dos circuitos sinápticos diferentes, con propiedades farmacológicas distintas: las de la "vía directa" y las de la "vía indirecta" (Fig. 4). Las NEM de la vía directa proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y el segmento interno del globo pálido, muestran una alta expresión de receptores dopaminérgicos tipo D1 y son ricas en SP y dinorfina, mientras que las NEM de la vía indirecta proyectan al segmento externo del globo pálido, muestran una alta expresión de receptores dopaminérgicos D2 y contienen neuroquinina B y ENKs (Gerfen, 1992; Nicola et al., 2000). Sin embargo, hay estudios que han revelado la presencia de NEM que expresan tanto receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2, así como la SP y las ENKs (Surmeier et al., 1996).

---



**Figura 4. Conexiones anatómicas del circuito ganglios basales-talamocortical, indicando paralelamente la vía directa e indirecta desde el estriado hacia los núcleos de salida de los ganglios basales.** Dos tipos de receptores (D1 y D2) están localizados sobre diferentes grupos de neuronas de salida del estriado, dando lugar a la vía directa y vía indirecta. Las flechas más claras indican la vía excitatoria, mientras que las más oscuras la vía inhibitoria. Abreviaciones: GPe (globo pálido externo), GPi (globo pálido interno), SNc (sustancia nigra pars compacta), STN (núcleo subtalámico). (Modificada de Kandel et al., 2000)

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

- A) Interneuronas colinérgicas: constituyen del 1-2 % del total de las células del estriado de rata, expresan la enzima AChE, su soma mide 50-60  $\mu\text{m}$  de diámetro y exhiben grandes árboles dendríticos ligeramente espinosos con un diámetro aproximado de 500  $\mu\text{m}$ . Estas interneuronas constituyen una de las

mayores fuentes de acetilcolina del sistema nervioso central (Bennett y Wilson, 2000; Wilson, 1998; Kawagushi et al., 1993);

B) Interneuronas que contienen parvalbúmina: neuronas no espinosas de tipo GABAérgico, su soma tiene un diámetro aproximado de 10-30  $\mu\text{m}$ , asimismo presentan varicosidades en las zonas más distales del soma y poseen campos dendríticos locales y extendidos (Bennett y Wilson, 2000; Wilson, 1998; Kawagushi et al., 1993);

C) Interneuronas que contienen somatostatina y óxido nítrico; neuronas de tipo bipolar y su soma mide entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, sus dendritas carecen de espinas y rara vez se ramifican. Presentan disparo regular con pronunciada adaptación y expresan la enzima sintetasa de óxido nítrico (Bennett y Wilson, 2000; Wilson, 1998; Kawagushi et al., 1993).

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

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Se considera que las aves y los mamíferos son filogenéticamente grupos terminales de la evolución de los vertebrados, los cuales se originaron a partir de reptiles, por lo que esta última clase de organismos ocupa un lugar crucial en la evolución de los cordados. En ese sentido, si los mamíferos se originaron a partir de reptiles, entonces es posible considerar que los ganglios basales, el circuito sináptico que lo integra y las propiedades electrofisiológicas que rigen este circuito, sean muy similares entre mamíferos y reptiles, es decir, que estas características se encuentren conservadas a lo largo de la evolución.

## **JUSTIFICACIÓN**

Los reptiles ocupan un lugar crucial en la evolución de los cordados. A pesar de esto, no se han estudiado completamente las propiedades electrofisiológicas de las estirpes neuronales de los ganglios basales en los reptiles. El conocimiento del origen evolutivo de las propiedades de las células de los ganglios basales es de suma importancia. Si partimos desde un punto de vista filogenético, la comparación de los parámetros electrofisiológicos de las células estriatales (la frecuencia de disparo neuronal; el patrón de disparo, en respuesta a un pulso cuadrado de estímulo; la latencia del potencial de acción; el valor umbral de activación; la identificación de las posibles conductancias iónicas involucradas en los diversos patrones de disparo neuronal; etc.), nos permitiría conocer cuáles fueron las influencias externas e internas que motivaron los cambios funcionales de dichas células. Por este motivo el presente trabajo tiene por objeto ampliar nuestro conocimiento sobre las propiedades electrofisiológicas de las NEM de reptiles como la tortuga y mostrar como el bloqueo de algunas conductancias iónicas presentes en las NEM produce cambios importantes en las propiedades de disparo de estas neuronas.

# OBJETIVOS

## General

- ❖ Estudiar el cambio en los patrones de disparo de las neuronas espinosas medianas del estriado de la tortuga por el bloqueo de algunas conductancias de potasio.

## Particulares

- ❖ Observar el efecto de bloqueadores inespecíficos de conductancias al potasio como la 4-aminopiridina, el tetraetilamonio y el cesio.
- ❖ Determinar si las corrientes de potasio modulan el patrón de disparo de las NEM del estriado de tortuga.
- ❖ Establecer que la corriente  $I_A$  está involucrada en la latencia del disparo para las NEM del estriado de tortuga de forma similar a lo observado en aves y mamíferos.
- ❖ Comprobar el papel de los canales rectificadores retardados en la generación de potenciales de acción, y cómo esta o estas conductancias se encuentran involucradas en la relación corriente-voltaje de las NEM de tortuga.
- ❖ Determinar si la corriente de rectificadores entrantes está involucrada en el potencial de acción de las NEM de tortuga.
- ❖ Señalar si existen diferencias o similitudes entre las propiedades electrofisiológicas de las NEM de tortuga y mamífero.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Organismos

Para la realización de este proyecto se utilizaron tortugas como grupo representativo de reptiles. Esta decisión se tomó con base a: A) que los antecesores directos de los mamíferos se han extinguido. Sin embargo, uno de los grupos con linaje evolutivo muy antiguo corresponde al de las tortugas, lo que lo hace adecuado para este tipo de estudios; B) la preparación de la tortuga ofrece múltiples ventajas para la elaboración de estudios electrofisiológicos, ya que en una sola rebanada es posible tener todas las conexiones que el estriado recibe, tanto los núcleos aferentes (corteza) como los núcleos eferentes (globo pálido, sustancia nigra), además de que en esta preparación se pueden realizar registros de varios días de duración, ya que el cerebro de la tortuga es muy resistente a la anoxia y se pueden obtener rebanadas de gran grosor; C) existen algunos trabajos electrofisiológicos realizados en diferentes estructuras nerviosas de tortugas, como grupo representativo de reptiles, lo que favorece la comparación de nuestros resultados con lo observado por otros autores; D) muchas especies de reptiles se encuentran en peligro de extinción, por lo que realizar investigaciones que demandan un número potencialmente elevado de organismos sólo aceleraría el proceso de extinción de las mismas.

Afortunadamente las especies de tortugas que se utilizaron para realizar los experimentos son muy abundantes y no se encuentran en peligro de extinción. Se utilizaron tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans* (tortuga japonesa de orejas rojas), adultas (15 cm de plastrón), sin distinción de sexo, que se adquirieron legalmente a proveedores reconocidos por la SEMARNAT. Posteriormente se criaron en condiciones óptimas en el Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala.

En nuestro laboratorio se han tomado provisiones para evitar el sufrimiento de los animales utilizados en este estudio, para ello todos los organismos se mantienen en condiciones de laboratorio, con libre acceso al alimento y al agua. Previo a cualquier manipulación experimental los organismos fueron anestesiados. Este laboratorio se adhiere a 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 Neuroscience).

### **Disección de Tortuga**

Después de anestesiar a la tortuga con pentobarbital sódico (100 mg/kg) en la parte anterior de las patas traseras, el cerebro fue removido e incluido en agar para la obtención de las rebanadas, las cuales fueron cortes coronales de los cerebros con un espesor de 300-500  $\mu\text{m}$  obtenidas a baja temperatura. Estas se obtuvieron con ayuda de un vibratomo, y se sumergieron en solución salina fría (en mM): 120, NaCl; 5, KCl; 2,  $\text{MgCl}_2$ ; 3,  $\text{CaCl}_2$ ; 15,  $\text{NaHCO}_3$ ; y 20 glucosa, pH 7.4; la solución fue saturada con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$  (Delgado-Lezama et al., 1999; Hounsgaard, 2002). Una vez obtenidas las rebanadas se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo no menor a 1 h. Posteriormente las rebanadas se trasladaron a una cámara de registro. En estas condiciones se pudieron obtener registros después de cuatro días de haber realizado la disección (Muñoz et al., 1998). La velocidad de perfusión fue un flujo constante de  $1.0 \pm 0.5$  ml/min de solución salina a temperatura ambiente.

Todos los fármacos que se utilizaron en el presente trabajo se disolvieron previamente en solución salina y se administraron a través del dispositivo de perfusión.

## **Sistema de Registro Intracelular**

Los registros se realizaron en el cerebro de tortuga en el área identificada como estriado dorso lateral, que corresponde al neoestriado de los mamíferos (paleostriatum augmentatum de acuerdo al atlas de Powers y Reiner, 1980). Las rebanadas fueron trasladadas a la cámara de registro donde fueron soportadas por dos redes de nylon y siempre perfundidas con la solución salina. Los registros se hicieron con microelectrodos contruidos con capilares de borosilicato. Estos fueron hechos en un estirador de pipetas (Sutter, P-87) y llenados con una solución 3 M de acetato de potasio. Se utilizaron microelectrodos cuya resistencia osciló entre 60 y 120 M $\Omega$ .

### **Obtención de registros**

Los registros se obtuvieron con un amplificador de alta impedancia (Cignus Technology, IR-183), en la modalidad de fijación de corriente. A través del electrodo de registro se inyectaron pulsos de corriente de diferente duración y amplitud sincronizados por computadora con el programa Lab View (National Instruments), y generados por una unidad de aislamiento (Digitimer LTD. DS2A). Con la inyección de corriente directa continua se mantuvo el potencial de membrana en los niveles requeridos (Pérez-Garci et al., 2003). Los registros se digitalizaron y se almacenaron para su posterior análisis.

Para obtener el registro intracelular se realiza al siguiente procedimiento: después de colocar la punta del microelectrodo en la superficie superior de la rebanada, se aplica un pulso cuadrado de corriente a través del microelectrodo, compensando su capacitancia y balanceando el puente producido por dicho pulso, se hace descender el microelectrodo y al mismo tiempo, se aplica un pulso cuadrado de

corriente intracelular y simultáneamente se observa en el osciloscopio cuando cambia el potencial de membrana.

Cuando esto sucede (indicando que ha cambiado la resistencia en la punta del electrodo) se hace vibrar dicha punta, inyectando choques de corriente por un periodo de tiempo muy breve. Cuando el cambio se debió a que la punta del electrodo toca la membrana de una neurona, eventualmente, la vibración hace que el electrodo penetre dicha membrana, en ese momento se observa en el osciloscopio que el potencial se hace bruscamente negativo y pueden producirse potenciales de acción espontáneos o provocados por inyección de corriente despolarizante. En este momento, se considera que el electrodo se encuentra en el interior de la célula de registro y se tiene entonces un registro intracelular.

### **Caracterización electrofisiológica**

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

Para la obtención de las curvas intensidad frecuencia (I-F) la célula se estimuló con pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades, registrándose para cada uno de ellos la respuesta en trazos de voltaje (trenes de potenciales de acción), para este protocolo la célula se mantuvo en un potencial de membrana de -80 mV.

Tanto las curvas I-V como las curvas I-F se obtuvieron en condiciones control (en ausencia de cualquier fármaco).

## **Protocolo Experimental**

Se realizaron curvas I-V e I-F, con el fin de obtener las características tanto pasivas como activas de las neuronas estriatales.

Cada experimento consistió de dos fases: un control, en ausencia de agonistas y una fase experimental, en presencia de los diferentes bloqueadores añadidos en el medio de perfusión.

## **Fármacos**

Se utilizaron bloqueadores inespecíficos de los canales de potasio (4-aminopiridina, cesio, tetraetilamonio). Todos ellos adquiridos a Sigma Chemical Co. (México).

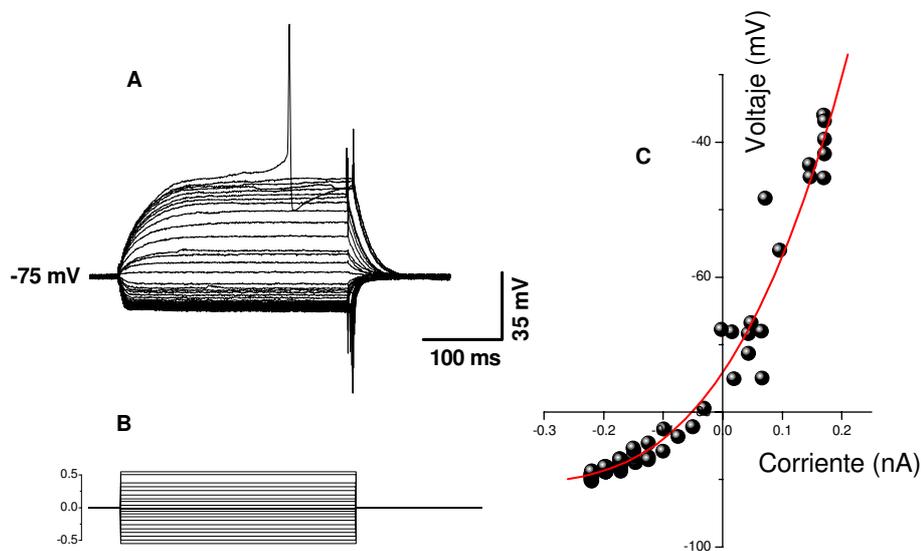
## **Análisis de datos**

Se tomaron muestras de datos antes y después de la aplicación de los bloqueadores de canales iónicos. Los cambios en las propiedades de los potenciales de acción, en la frecuencia de disparo, o en las curvas I-V se expresan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Para el análisis se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas (*t* de Student para datos pareados, previa prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov) y no paramétricas (prueba de Wilcoxon).

# RESULTADOS

## Caracterización electrofisiológica

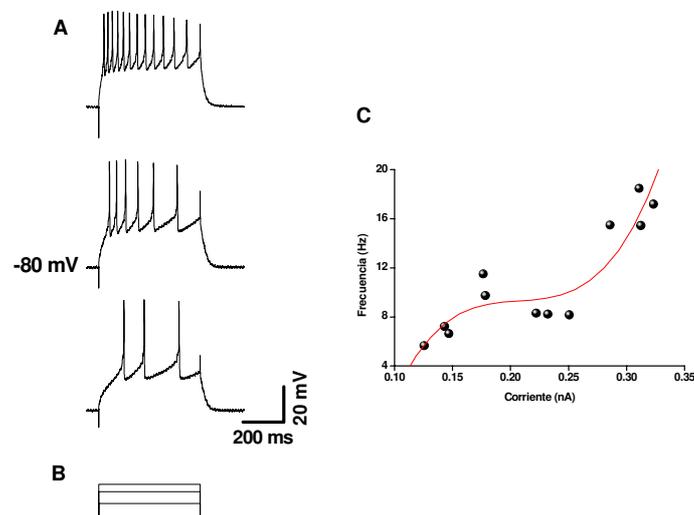
En la figura 5 se muestran los trazos de voltaje en respuesta a pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades. Como se puede observar la curva intensidad-voltaje exhibe rectificación a un potencial de -75 mV. En mamíferos se ha reportado que esto se debe a la activación de conductancias ( $I_{K_{ir}}$ ) de potasio (Galarraga et al., 1994 y Nisenbaum y Wilson, 1995), impidiendo que el potencial de la membrana se haga más negativo conforme aumentan los pulsos de corriente hiperpolarizante, asimismo cuando se mandan pulsos de corriente



**FIGURA 5. Curva Intensidad-Voltaje de las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga**  
A) Trazos de voltaje de una NEM en respuesta a pulsos de corriente. B) Pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades aplicados con un potencial de mantenimiento de -75 mV C) Se muestra la relación Intensidad-Voltaje tomada en la parte estable del registro.

despolarizante, las NEM respondieron con un incremento gradual tipo rampa en el potencial de la membrana con un marcado retraso en la aparición del potencial de acción. Tanto en mamíferos como en aves se ha reportado que esta característica se debe a la activación de corrientes de potasio tipo A, que son sensibles a la 4-AP (Bargas et al., 1989; Farries y Perkel, 2000).

En la figura 6 se muestran los trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de 3 pulsos de corriente despolarizante de diferente intensidad, así como la relación intensidad-frecuencia en las NEM de tortuga; se puede apreciar adaptación en el patrón de disparo de las neuronas, y es posible que la adaptación y la disminución en el retraso del disparo se deba a la entrada de calcio por canales sensibles al voltaje, probablemente de tipo L (Pérez-Garci et al., 2003).



**FIGURA 6. Frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas del estriado de la tortuga, en respuesta a diferentes pulsos de estimulación. A) Cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción como respuesta a los diferentes pulsos de estimulación, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. B) Pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades aplicados. C) Curva Intensidad-Frecuencia donde se grafica la frecuencia del tren de potenciales de acción.**

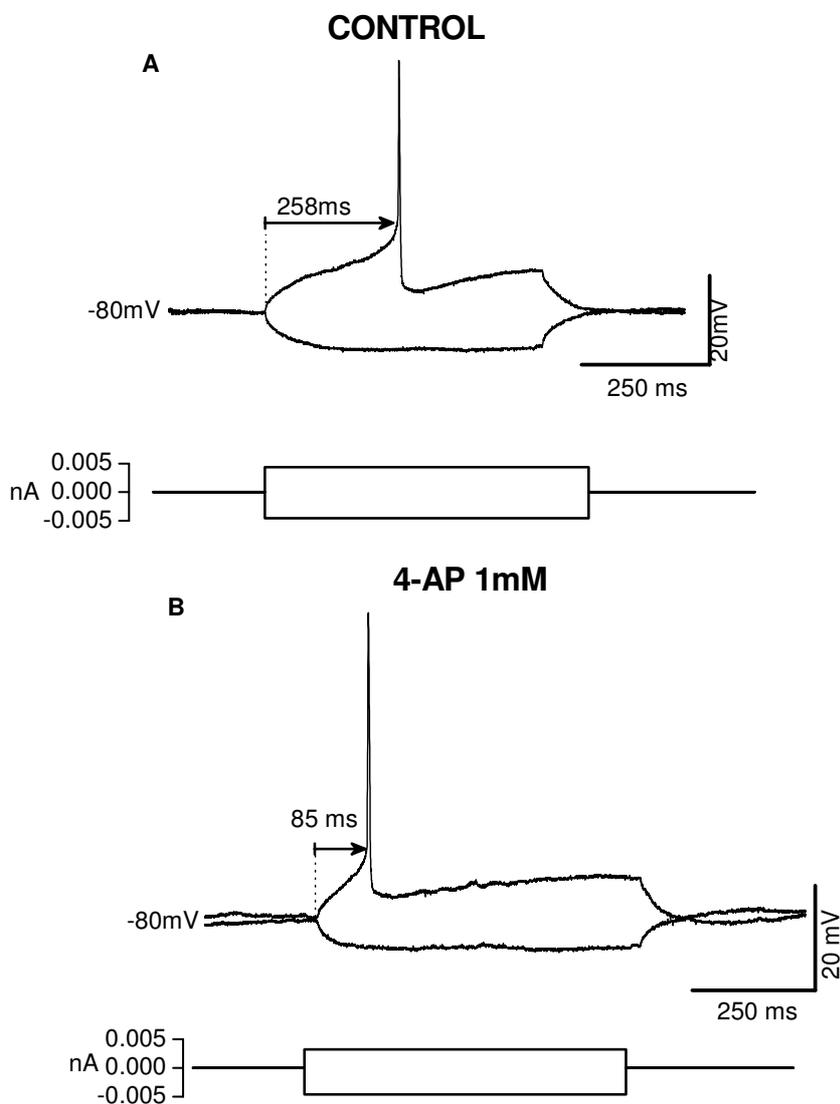
## Conductancias iónicas

### Efecto de la 4-Aminopiridina

En la figura 7 se muestra el efecto de 1 mM de la 4-AP en el patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga producidos desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Como se puede observar en la figura control (7A), la aparición del primer potencial de acción tiene una latencia característica de este tipo de neuronas, de  $208 \pm 33.5$  ms ( $n = 9$ ), y que se debe a la activación de una corriente transitoria rápida (principalmente  $I_A$ ) del que se aprecia claramente el componente lento activada a partir de -60 mV, que estaciona el potencial de membrana en valores subumbrales o impide que se haga más positivo (Galarraga et al., 1994). En la tortuga esta conductancia resulto sensible a la 4-AP, ya que produjo un retraso en la aparición del potencial de acción en respuesta a pulsos de corriente despolarizante similar a lo observado en aves y mamíferos (Farries y Perkel, 2000; Venance y Glowinski, 2003; Nisenbaum y Wilson 1995).

En la figura 7B se puede observar que en presencia de la 4-AP la latencia para el inicio del primer disparo disminuyó significativamente, en su lugar se observa un disparo con una latencia mucho menor,  $82.8 \pm 20$  ms ( $n=9$ ,  $P<0.001$ , prueba de *t* de Student).

El cambio en la latencia del disparo por la aplicación de 1 mM de la 4-AP, nos indica la presencia de una corriente iónica de potasio (presumiblemente la corriente tipo  $I_A$  (Hille, 2001; Galárraga y Bargas, 1998), ya que a esa concentración de la 4-AP principalmente se bloquea dicha corriente transitoria. Esta corriente por lo general presenta dos componentes, uno rápido ( $I_A$ ) y otro lento ( $I_D$ ) que es el que produce el retraso en el disparo y que es la corriente que nosotros mostramos (Galárraga y Bargas, 1998).



**FIGURA 7. Efecto de la 4-aminopiridina sobre el disparo de las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga.** A) Registro control tomado antes de la aplicación de la 4-AP (1 mM). Nótese la duración de la latencia (258 ms), característico de estas neuronas. B) La aplicación de 4-AP (1 mM) produjo una disminución significativa de la latencia (85 ms) para la aparición del primer potencial de acción.

Esta corriente es responsable de bajas frecuencias de disparo, ayuda a generar el disparo rítmico, repolariza potenciales de acción y potenciales despolarizantes, además de regular el umbral de disparo; la latencia en el disparo se debe a que la despolarización induce corrientes transitorias salientes de  $K^+$  antes de inducir las

corrientes entrantes de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{++}$  propias del potencial de acción, es decir, lo primero que produce el estímulo es un potencial hiperpolarizante previo al disparo del potencial de acción que únicamente retrasa la llegada al potencial umbral, y como la latencia de la neurona depende de la cinética de inactivación de estos canales transitorios, al bloquearlos con la 4-AP se observa la disminución de dicha latencia, y con ello se puede explicar el retraso en la aparición del disparo del potencial de acción producido por la corriente  $I_A$ .

### **Efecto del Tetraetilamonio**

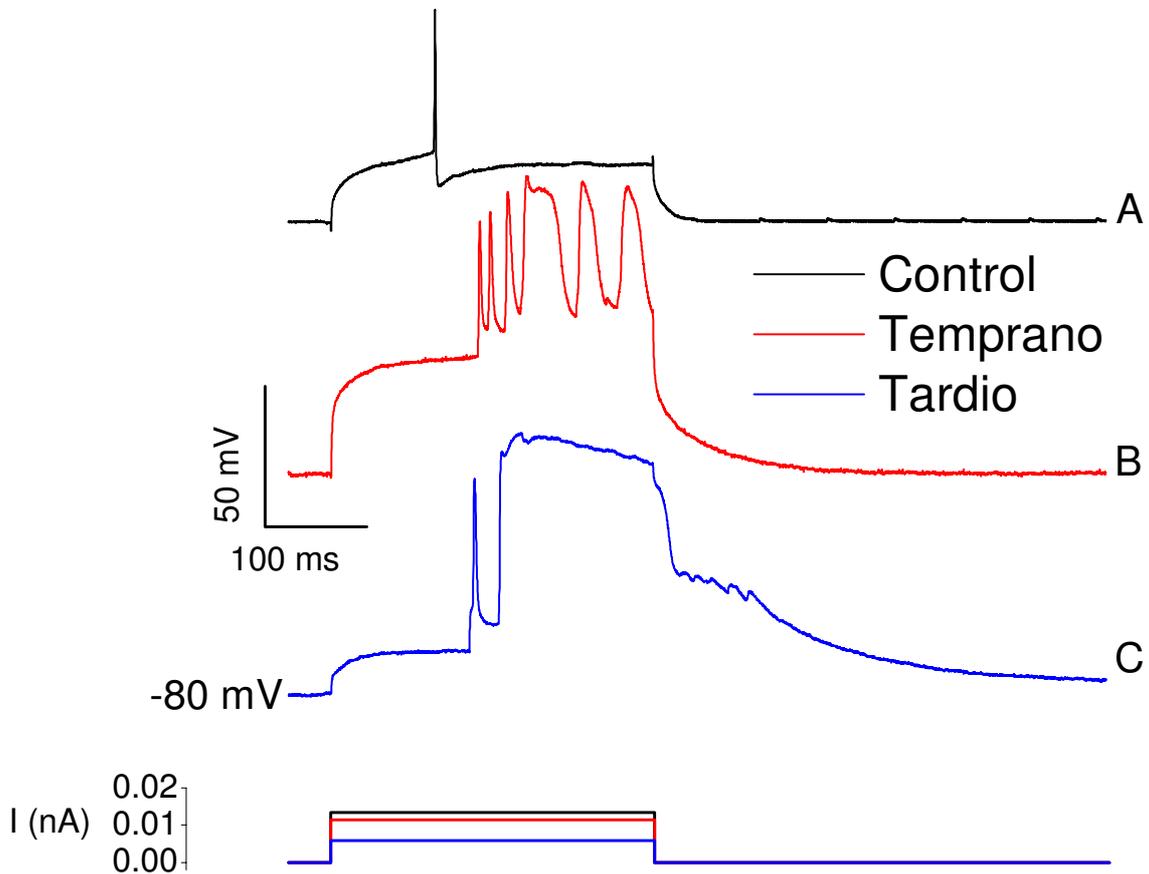
Para bloquear los canales de potasio de manera inespecífica utilizamos el tetraetilamonio (TEA), que también se ha utilizado como una sonda molecular para la boca del poro interno o externo de los canales de potasio dependientes de voltaje (Denton y Leiter, 2002; Crouzy et al., 2001), el cual bloquea la vía de permeación, y ocluye el movimiento de los iones potasio a través del poro (Crouzy et al., 2001). El TEA es un ión pequeño que bloquea los canales de potasio abiertos, pudiendo actuar tanto externa como internamente (Crouzy et al., 2001; Meir et al., 1999; Hille, 2001), pues al actuar por el lado extracelular bloquea a los canales rectificadores retardados, así como a la corriente A, a la corriente dependiente de calcio (específicamente BK) (Meir et al., 1999; Hille, 2001), al rectificador entrante y a los canales de potasio dependientes de ATP (Takako et al., 1996); mientras que por el lado intracelular no bloquea a las corrientes rectificadoras entrantes (Hille, 2001). Se sabe que 20 mM de TEA bloquea completamente a los BK, y a la mayor parte, sino es que a todos los subtipos de canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_V$ ), excepto a  $K_V1.2$  (Takako, 1996). Los canales de potasio se pueden dividir en dos categorías dependiendo la sensibilidad del canal hacia el TEA: aquellos que son altamente selectivos ( $K_i$  menor a

1 mM) y aquellos que son relativamente insensibles ( $K_i$  mayor a 20 mM). Se sabe que el canal “*Shaker*” de  $K^+$ , Kv1.1, (Hille, 2001) tiene alta afinidad por el TEA y produce el bloqueo de la boca del poro con alta afinidad (Denton y Leiter, 2002).

En la figura 8 se observa el efecto del TEA (20 mM) sobre las propiedades de disparo en las NEM del estriado de la tortuga producidos desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Como se puede observar en la parte superior de la figura (8A), el registro control muestra un disparo característico de una NEM con una duración del potencial de acción de  $5.5 \pm 0.5$  ms medido desde el umbral de disparo ( $n=7$ ). En el trazo medio (Fig. 8B) se observa el efecto temprano del TEA 20 mM, donde es característico la presencia de potenciales de acción rápidos y lentos con un incremento en la duración del potencial de acción de  $16.7 \pm 5.1$  ms. Finalmente, en el trazo inferior (Fig. 8C) se muestra el efecto tardío del TEA. Aquí típicamente se observó un potencial de acción único y rápido seguido de un potencial de calcio evocado por TEA, el cual se desenmascara por el bloqueo de las conductancias de potasio, al bloquear a los canales de potasio, la estimulación permite que los canales de calcio dependientes de voltaje permanezcan más tiempo abiertos, lo cual aumenta la depolarización, y por consiguiente una mayor entrada de calcio (Sugimori et al., 1978; Reyes et al., 1998; Hernández-López et al., 1997). Muy probablemente el potencial de acción previo se origine en el cono axónico, y se deba a que el TEA actúa principalmente obstruyendo la boca del canal de potasio. Nosotros creemos que este potencial es tan rápido que el TEA no alcanza a bloquearlo la mayor parte de las veces. Quizás lo más notorio de esta respuesta sea el ensanchamiento total del disparo  $129.05 \pm 24.49$  ms ( $n=7$ ,  $P=0.002$ , prueba de  $t$  de Student).

---

### Efecto del TEA (20 mM)



**FIGURA 8. Efecto del Tetraetilamonio sobre las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga.** A) Control tomado a un potencial de mantenimiento de -80 mV, nótese un potencial de acción característico de una NEM. B) Efecto temprano del TEA (20 mM), obsérvese la presencia de disparos rápidos y el incremento en la duración del potencial de acción evocados por TEA. C) Efecto tardío del TEA a la misma concentración, apréciase el ensanchamiento del disparo por el bloqueo de la conductancia de  $K^+$  de rectificadores retardados, es muy característica la aparición de un potencial de acción rápido seguido de un potencial tardío de calcio.

---

### Efecto del Cesio

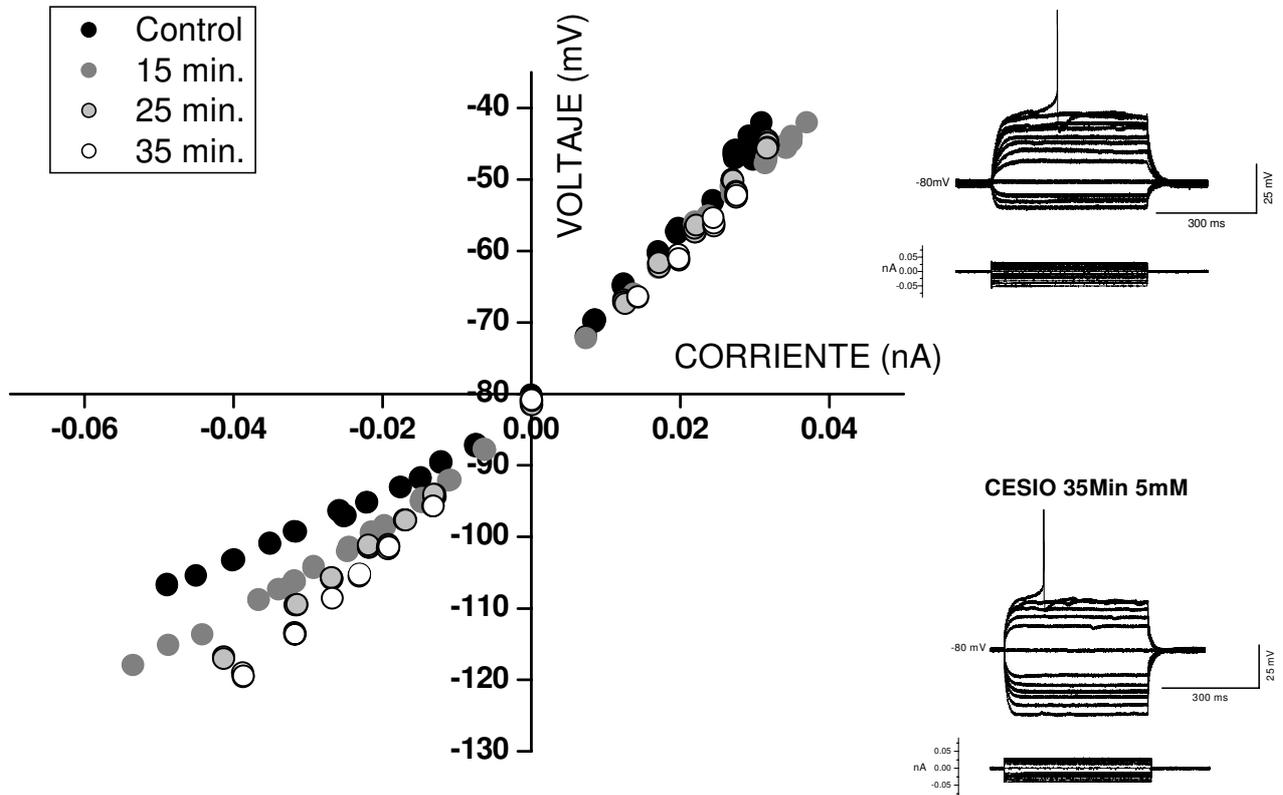
El cesio es un agente bloqueador no específico para los canales de potasio que cuando se aplica extracelularmente puede bloquear a los canales de potasio rectificadores entrantes (Nisenbaum y Wilson, 1995), a los rectificadores retardados,

las corrientes tipo A (Bielefeldt et al., 1992) y a los canales de potasio dependientes de ATP, en tanto que por el lado intracelular puede bloquear al canal rectificador retardado (Hille, 2001). En general los canales rectificadores entrantes ( $K_{IR}$ ) estabilizan el potencial de reposo cerca del equilibrio del  $K^+$  y están involucrados en el transporte de  $K^+$  a través de la membrana (Ashcroft, 2000)

Se sabe que los rectificadores de corriente entrante o anómalo, contribuyen a fijar el potencial de membrana en reposo, además de oponerse a la hiperpolarización excesiva (Galárraga y Bargas, 1998), ya que esta corriente aumenta al estar hiperpolarizada la neurona y disminuye conforme se depolariza. El canal responsable de esta corriente es el  $K_{IR}$ , que se abre a potenciales hiperpolarizados, además de depender de la concentración del ión  $K^+$  extracelular (Hille, 2001). Esta conductancia que se bloquea con cesio extracelular (Nisenbaum y Wilson, 1995; Reyes et al., 1998; Hille 2001), es la responsable de la rectificación en las NEM del estriado de tortuga, ya que al ser bloqueada se pierde esta rectificación.

Como se puede observar en la figura 9, la aplicación del  $Cs^+$  muestra un efecto gradual respecto al tiempo de aplicación, mostrando un cambio significativo en la rectificación de la NEM al cabo de 35 minutos en presencia de  $Cs^+$  (5 mM) ( $n=5$ ,  $P=0.036$ , prueba de  $t$  de Student), donde la relación corriente-voltaje pasas de rectificante a lineal. Se muestra además el registro electrofisiológico antes y después de la aplicación de  $Cs^+$ . Nótese además que a valores depolarizantes no se aprecian diferencias importantes en la curva I-V antes y después de la aplicación de  $Cs^+$ , el cambio sólo se aprecia durante la aplicación de pulsos hiperpolarizantes, afectando al parecer, sólo a la rectificación.

## EFEECTO DEL CESIO 5 mM



**FIGURA 9. Efecto del cesio (5 mM) sobre las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga.** Control tomado a un potencial de mantenimiento de -80mV. A la derecha se muestran registros del efecto gradual del cesio (5 mM), mostrando la pérdida de la rectificación de la NEM a 35 minutos de exposición al cesio (panel inferior) con respecto al control (panel superior).

## DISCUSIÓN

En este trabajo nos enfocamos a ver, en primer término, las principales características del patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas en el estriado de la tortuga. Además observamos que distintos tipos de conductancias de potasio pueden alterar significativamente diferentes propiedades del patrón de disparo en este tipo de neuronas. Nuestros resultados confirman la presencia de canales de potasio, que al ser bloqueados, producen efectos similares en las propiedades de disparo a lo ya reportado en aves y mamíferos (Sugimori et al., 1978; Pineda et al., 1992; Flores-Hernández et al., 1994; Nisenbaum et al., 1994; Hernández-López et al., 1997; Reyes et al., 1998; Luo y Perkel, 1999; Farries y Perkel, 2000; 2002; Ding y Perkel, 2002; Perkel et al., 2002; Farries et al., 2005); Asimismo, los resultados de este estudio electrofisiológico se suman a los datos neuroanatómicos e histoquímicos que proponen que la estructura de los ganglios basales aparece tal y como la conocemos desde reptiles hasta los mamíferos; lo que sugiere que la evolución de los ganglios basales en general y de forma particular la de las neuronas espinosas del estriado está conservada al menos en los amniotas. Todo esto permite plantear la hipótesis de que al menos en los amniotas, las neuronas del estriatales juegan el mismo papel en el circuito sináptico involucrado en la regulación de las funciones motoras de los diferentes grupos.

Algunas de las conductancias intrínsecas de las neuronas espinosas medianas están involucradas en la regulación del disparo, o en el mantenimiento del potencial de la membrana, tal es el caso de las conductancias de potasio. En este trabajo decidimos estudiar la forma en que el bloqueo de algunas de estas conductancias afecta a las propiedades de disparo en estas neuronas. Los efectos de bloquear algunas de estas conductancias son muy conocidos en mamíferos (Wilson, 2004) y

han servido para caracterizar a este tipo de neuronas en los ganglios basales de otros grupos, como las aves (Farries y Perkel, 2002; Farries et al., 2005). En el caso de los reptiles aún no se cuenta con información que integre las acciones de bloqueadores de potasio de los principales grupos de amniotas, es por ello que decidimos utilizar bloqueadores inespecíficos de los canales de potasio como la 4-AP, el TEA y el cesio.

### **El Efecto de la 4-aminopiridina**

Una de las corrientes de potasio sensibles a la 4-AP, que se activa durante los potenciales de acción, es una corriente transitoria rápida (principalmente  $I_A$ ), que estaciona el potencial de membrana en valores subumbrales e impide que se haga más positivo (Galarraga et al., 1994). En el caso de la tortuga esta conductancia produce una rampa y un retraso de la espiga en respuesta a pulsos de corriente despolarizante similar a lo observado en aves y mamíferos (Farries y Perkel, 2000; Venance y Glowinski, 2003; Nisenbaum y Wilson 1995). El cambio en la latencia del disparo por la aplicación de 1 mM de la 4-AP nos indica la presencia de esta corriente de potasio (Hille, 2001; Galárraga y Bargas, 1998), ya que a esa concentración de 4-AP principalmente se bloquea la corriente transitoria  $I_A$ , la cual tiene dos componentes, uno rápido y otro lento que es el que produce el retraso en el disparo (Galárraga y Bargas, 1998; Nisembaum et al., 1994). La disminución en la latencia del disparo se debe a la despolarización que induce corrientes transitorias salientes de  $K^+$  antes de inducir las corrientes entrantes de  $Na^+$  y de  $Ca^{++}$  propias del potencial de acción, ya que la latencia de la neurona depende de la cinética de inactivación de estos canales transitorios, al bloquearlos con 4-AP se observa la pérdida de latencia, y con ello se puede explicar el retraso en la aparición del disparo del potencial de acción producido por la corriente  $I_A$ .

Los resultados obtenidos en reptiles mostraron similitud con las NEM de mamífero y aves, ya que por una parte los trabajos realizados en aves (Farries y Perkel, 2000; 2002; Farries et al., 2005), utilizando la preparación de rebanadas de cerebro de aves canoras y pollos, muestran prácticamente lo observado en reptiles, una latencia en el potencial de acción y la disminución de esta a la aplicación de 4-AP. Por otra parte lo reportado para mamíferos por Nisenbaum et al., (1994) muestra resultados similares. En ese sentido la reducción de la latencia del potencial de acción observada para los amniotas es relevante, ya que se ha mantenido conservada a lo largo de la evolución, por lo que es posible que esta corriente de potasio  $I_A$  asegure la respuesta electrofisiológica de la neurona, ya que las NEM al tener propiedades bi-estables y mantenerse en un potencial de reposo de aproximadamente -70 mV, necesitan una gran entrada cortical para poder responder. En ese sentido la corriente  $I_A$ , al marcar un retardo y una rampa para el inicio del potencial de acción, nos lleva a pensar que estas neuronas aseguran su disparo después de la estimulación cortical y así poder garantizar la respuesta de la neurona sobre las neuronas del globo pálido.

Además la corriente  $I_A$  producida es importante 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.

## El efecto del TEA

La mayor parte de las conductancias de potasio son bloqueadas por el TEA (Faber y Sah, 2000; Xu et al., 2001; Tan y Llano, 1999). Los canales de potasio sensibles al TEA se pueden agrupar en dos categorías; cuando actúa externamente; los que son altamente sensibles ( $K_i < 1$  mM; Hille, 1967) y los que son relativamente insensibles ( $K_i > 20$  mM; Armstrong y Binstock, 1965).

Canales de potasio activados por calcio los  $BK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$  que típicamente son bloqueados selectivamente por la iberotoxina y apamina respectivamente, y que también son bloqueados por el TEA cuando se aplica extracelularmente (Meir et al., 1999), aunque los canales  $BK_{Ca}$  parecen ser más sensibles a la aplicación interna de TEA que los canales  $SK_{Ca}$ . La alta sensibilidad de los  $BK_{Ca}$  hacia el TEA consiste en la presencia de un residuo aromático en la boca del poro en este canal (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y MacKinnon, 1992). Sin embargo, el TEA bloquea preferencialmente a las conductancias BK (Faber and Sah, 2003; Xu et al., 2001; Tan and Llano, 1999). Los canales de potasio rectificadores entrantes y retardados también son sensibles al TEA extracelular (Nicoll et al., 1990; Meir et al., 1999), aunque lo son a concentraciones relativamente bajas (0.3-1 mM).

Los canales de potasio tipo A transitorios generalmente exhiben una baja sensibilidad al TEA externo. Como consecuencia bajas concentraciones de TEA son usadas rutinariamente para identificar corrientes de potasio tipo A ( $I_A$ ) de otras corrientes de potasio, tales como rectificadores retardados (Denton y Leiter, 2002). Sin embargo, se ha visto que la corriente A es sensible al TEA en concentraciones bajas de 1-2 mM (Thorn et al., 1991).

Concentraciones elevadas del TEA (10-20 mM) bloquean muchos tipos de canales de potasio que son dependientes de voltaje (Kv 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4,) (Coetzee et al., 1999; Ishikawa et al., 2003). El TEA a bajas concentraciones (2 mM) inhibe al Kv 3.1 en preparaciones de mamífero (Wang, 1998). Los resultados obtenidos después de aplicar el TEA a las neuronas espinosas medianas de la tortuga sugieren que este bloqueador inespecífico pudiera estar actuando sobre un tipo de rectificador retardado que está participando en la generación del potencial de acción, de manera similar a lo observado en mamíferos; ya que a la aplicación de 20 mM de TEA produjo el ensanchamiento del disparo. Por otro lado, el bloqueo de las conductancias de potasio por el TEA incrementa el tiempo que se mantiene depolarizada la membrana después de un potencial de acción, por lo que los canales de calcio dependientes de voltaje permanecen por más tiempo abiertos. Esto explicaría, los potenciales de calcio evocados por TEA que se observan en la figura 8 (B y C).

Durante la aplicación del TEA, se observaron potenciales de acción que aparentemente son de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, y que, sin embargo, el TEA no fue capaz de bloquear. Una posible interpretación es que el TEA sólo bloquea el canal cuando éste está abierto (Hille, 2001). Por otro lado, el ensanchamiento del disparo se debe a la entrada de calcio y que al no haber salida de potasio, la repolarización es más lenta, ya que solo se debería a la acción de bombas metabólicas, como el intercambiador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> (Hammond, 2001; Hille, 2001).

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado en mamíferos por otros investigadores, como Reyes et al., (1998), que aplicó TEA a concentraciones de 5 y 10 mM en una preparación de rebanadas de cerebro de rata, y donde reporta el ensanchamiento del potencial de acción. Además, se observa la presencia de un

potencial único y rápido muy parecido a lo mostrado en la tortuga, otros investigadores como Hernández-López et al., (1997), quienes al aplicar 20 mM de TEA observando el mismo efecto, incluyendo la presencia del potencial de acción rápido previo al potencial ensanchado de calcio. Estos trabajos que mostraron el efecto de concentraciones altas de TEA en NEM de rata, no varían a lo reportado por Pineda et al., (1992) quienes aplicaron concentraciones de 0.5 y 1 mM de TEA y Sugimori et al., (1978) que aplicaron concentraciones de 1.5 mM de TEA, aunque en los trabajos de Pineda et al. no se observa la presencia del potencial de acción rápido, esto tal vez debido a las diferencias farmacológica que presentan los canales de potasio, lo que puede explicar entonces porque la aplicación de concentraciones altas del TEA (20 mM) bloquean prácticamente todas las corrientes de potasio. No obstante la aplicación de concentraciones menores no muestra diferencias relevantes. Por otra parte, no parecen existir trabajos sobre la aplicación de TEA en NEM de aves, pero por los resultados obtenidos en reptiles y los resultados consultados para mamíferos podemos aseverar que esta conductancia de potasio atribuida a una corriente de rectificadores retardados se ha mantenido altamente conservada entre los amniotas.

### **El Efecto del Cesio**

El cesio es un agente bloqueador no específico para los canales de potasio que extracelularmente puede bloquear a los canales de potasio rectificadores entrantes, (Nisenbaum y Wilson, 1995) a los rectificadores retardados, las corrientes tipo A (Bielefeldt et al., 1992) y a los canales de potasio dependientes de ATP en tanto que por el lado intracelular puede bloquear al canal rectificador retardado (Hille, 2001).

En general muchos de los canales de potasio se bloquean extracelularmente por la aplicación de cesio (Castle et al., 1989). Sin embargo, hay algunos reportes de que algunos tipos de canales de potasio son relativamente insensibles al cesio

(Edwards y Weston, 1994). Los canales de potasio rectificadores entrantes ( $K_{IR}$ ) son bloqueados por cesio extracelular, pero las propiedades del bloqueo difieren entre los diferentes tipos de canales (Bertrand, 2003).

Cuando aplicamos cesio a las NEM de la tortuga, observamos que tarda mucho tiempo en hacer su efecto, lo que sugiere que este ión se internaliza y está bloqueando por el lado citoplásmico, actuando principalmente sobre algún tipo de canales de potasio rectificadores entrantes. El principal efecto observado en las NEM después de aplicar el  $Cs^+$  fue eliminar la rectificación característica de estas células, siendo nuestros resultados estadísticamente significativos.

Los canales de potasio bloqueados por la aplicación de  $Cs^+$  (5 mM) en la tortuga, son tal vez los rectificadores de corriente entrante o anómalo, que se bloquean con las mismas concentraciones de  $Cs^+$  en preparaciones de mamífero (Reyes et al., 1998), resultados similares se observan también en aves (Farries y Perkel, 2002). Los canales rectificadores anómalos contribuyen a fijar el potencial de membrana en reposo, además de oponerse a la hiperpolarización excesiva (Galárraga y Bargas, 1998). Esta corriente se incrementa al estar hiperpolarizada la neurona y disminuye conforme ésta se depolariza, el canal  $K_{IR}$  responsable se abre sólo si se encuentra hiperpolarizado, además depende de la concentración del ión  $K^+$  extracelular (Hille, 2001).

En los mamíferos esta conductancia ( $K_{IR}$ ) se bloquea con cesio extracelular (Nisenbaum y Wilson, 1995; Reyes et al., 1998; Hille 2001), siendo al parecer, la misma que produce el bloqueo de la rectificación en las NEM del estriado de tortuga.

Los resultados obtenidos no difieren de lo reportado para amniotas, por una parte Farries y Perkel en 2002 aplicaron  $Cs^+$  en las NEM del estriado de ave, obteniendo resultados muy similares a lo reportado por Reyes en 1998 en las NEM de

rata y Nisembaum y Wilson en 1995, observando en los experimentos la pérdida de la rectificación entrante, esto nos indica que esta conductancia iónica de potasio, al parecer, se ha mantenido conservada a lo largo de la evolución.

De manera general los resultados obtenidos en las NEM de la tortuga nos muestran como diferentes corrientes de potasio pueden regular algunas propiedades electrofisiológicas tanto en el reposo, como en el patrón de disparo y la generación de potenciales de acción de estas células. Las corrientes de potasio que se muestran en la presente Tesis son:

1.- Corriente transitoria rápida  $I_A$  lenta (del tipo  $I_D$  caracterizada por una tasa de inactivación intermedia o lenta, con una  $\tau \cong 250$  ms): que fue bloqueada con 1 mM de 4-AP. Esta corriente mantiene el potencial de membrana en valores subumbrales o impide que se haga más positivo (Galarraga et al., 1994), además de ser la responsable de producir una rampa y el retraso de la espiga en respuesta a pulsos de corriente despolarizante (Farries y Perkel, 2000; Venance y Glowinski, 2003; Nisenbaum y Wilson, 1995). Nuestros registros no mostraron el componente rápido de esta conductancia.

2.- Corriente de rectificadores retardados: que fue bloqueada con 20 mM de TEA (Hille, 2001; Coetze et al., 1999), aunque muchas de las conductancias de potasio son bloqueadas por altas concentraciones de TEA al ser un bloqueador no específico de canales de potasio (Faber y Sah, 2000; Xu et al., 2001; Tan y Llano, 1999), se desenmascara entre otras, una corriente de calcio evocada por TEA (Sugimori et al., 1978; Reyes et al., 1998; Hernández-López et al., 1997).

3.- Corriente de rectificadores entrantes  $I_{KIR}$ : que fue bloqueada con 5 mM de cesio, que es un bloqueador no específico para los canales de potasio que por el lado extracelular puede bloquear a los canales de potasio rectificadores entrantes, (Nisenbaum y Wilson, 1995). Esta corriente es la responsable de la rectificación en los potenciales de acción de las NEM del estriado de tortuga.

La presencia de estas corrientes de potasio en las NEM de tortuga nos revela su importancia en las funciones celulares, de esta manera no es difícil comprender por qué en el cerebro de mamíferos se encuentran presentes la mayoría de los tipos de canales de  $K^+$ , como sabemos se han podido identificar en la corteza cerebral, tálamo, cerebelo, hipotálamo, bulbo olfatorio, estriado, entre otras estructuras del cerebro (Coetzee et al., 1999); aunque es poco lo que se conoce acerca de su ubicación en la célula, axones, somas, dendritas o terminales (Coetzee et al., 1999; Dodson y Forsythe, 2004). Es claro entonces, que los canales de potasio son estructuras críticas para la regulación en el sistema nervioso y que alteraciones en estos pueden generar cambios desde imperceptibles hasta desordenes que se manifiestan en enfermedades tales como la ataxia episódica tipo 1, la epilepsia neonatal benigna, la distrofia miotónica muscular, el síndrome QT largo, el síndrome de Bartter, la hipoglucemia de la infancia y la diabetes mellitus, entre otras (Ashcroft, 2000). En ese sentido es claro entender que por las diferentes funciones que realizan los canales de potasio dependientes de voltaje existe una gran diversidad de éstos expresándose en las neuronas con diferentes constantes de tiempo y con múltiples dependencias de voltaje, mismas que se han mantenido a lo largo de la evolución.

Los resultados obtenidos mostraron mucha similitud con las NEM de mamífero y de ave, tanto en sus propiedades electrofisiológicas como en su funcionalidad en el patrón de disparo. Esto nos permite sugerir que la función del estriado en el control de

las actividades motoras ya estaba establecida desde los primeros reptiles. Entonces, es posible que la evolución de la corteza de los reptiles a la neocorteza de los mamíferos, lo que permitió el incremento en el repertorio de las conductas motoras, trayendo como consecuencia una multiplicidad de movimientos estereotipados, lo cual mejoró la integración y complejidad del comportamiento motor de estos organismos; siendo parte del éxito biológico de los mamíferos.

La gran similitud entre las propiedades electrofisiológicas de las NEM de reptil, ave y mamífero, como se ha mencionado anteriormente, nos permiten suponer la alta conservación funcional de los ganglios basales entre los amniotas. Sin embargo, esto no significa que necesariamente sea idéntica. Así pues podemos inferir que aunque la mayoría de los grupos de células y conexiones en los ganglios basales pueden ser homologados en todos los tetrápodos, la manera en que los flujos de información atraviesan los ganglios basales posiblemente difiere entre anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Striedter, 2005).

De esta forma, tomando en cuenta los resultados neuroanatómicos e inmunocitoquímicos además de los resultados electrofisiológicos de la presente Tesis, nos permiten apoyar la idea general de que el circuito de los ganglios basales es similar en los amniotas y por lo tanto que las diferentes conductancias presentes en la regulación del potencial de acción es un mecanismo de modulación estriatal altamente conservado en estos organismos.

Lo anterior reafirma la idea de que la evolución de los ganglios basales pudo haberse dado en diversas etapas a lo largo de la evolución de los vertebrados y que aunque durante este proceso la integración de la información fue haciéndose más compleja, repercutiendo en las funciones motoras, el papel funcional de las

conductancias iónicas ya estaba establecido desde los primeros amniotas (Northcutt, 1981; Striedter, 1997; Pough et al., 1999). Tal vez el principal detonador del desarrollo de los ganglios basales ocurrió durante la transición del medio acuático al medio terrestre, es decir, en la transición entre anfibios y reptiles (Marín et al. 1997; 1998; Reiner et al., 1998). Una posible causa de ello sería que el desarrollo de conductas locomotoras en el medio ambiente acuático se encuentra muy limitado si lo comparamos con la gran diversidad de patrones conductuales de los animales terrestres. Por lo que habría que verificar si esta modulación del patrón de disparo no cambia en la transición evolutiva de anamniotas a amniotas, realizando estos experimentos en los organismos filogenéticamente inferiores más próximos, como los anfibios.

## CONCLUSIONES

- ❖ Las corrientes de potasio estudiadas modulan el patrón de disparo y algunas propiedades electrofisiológicas de las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga.
- ❖ Los resultados obtenidos muestran la presencia de corrientes transitorias rápidas, rectificadora entrante, así como la presencia de rectificadores retardados en las neuronas espinosas medianas del estriado de la tortuga.
- ❖ La corriente  $I_A$  está involucrada en la latencia del disparo para las NEM del estriado de tortuga de forma similar a lo observado en aves y mamíferos.
- ❖ De manera general se ha mostrado la presencia de conductancias iónicas de potasio presentes en la regulación del potencial de acción de las neuronas espinosas medianas del estriado de tortuga, estos resultados son muy similares a lo ya reportado en aves y mamíferos,
- ❖ Todo lo anterior sugiere que las propiedades de disparo de las neuronas estriatales y las conductancias involucradas se encuentra altamente conservadas entre los amniotas.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Albin RL, Young AB, Penney JB. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS*, 12:366-375.C
- 2.- Alexander S.P.H.; A. Mathie y S.J.A. Peter (2004). Potassium channels, in *Guide to receptors and channels*. *Br. J. Pharmacol.* 141: 583-584, 153 (suppl 2): S1-S209.
- 3.- Amstrong CM y Binstock L. (1965). The selective inhibition of delayed potassium channels of giant axons. *J. Gen. Physiol.* 58: 413-437.
- 4.- Amstrong CM y Hille B. (1972). The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *J. Gen. Physiol.* 59:388-400.
- 5.- Ashcroft F.M. (2000). *Ion Channels and Disease. Channelopathies*. Academic Press. USA.
- 6.- Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res*, 75(1):146-156.
- 7.- Bargas J., E. Galarraga y J. Aceves. (1998) Los GB. En: *Fisiología, células, órganos y sistemas*. Vol. 5 Cap X.13. Muñoz, E.J. y X. Garcia (Eds.). FCE México. pp 257-273.
- 8.- Barral J, Galarraga E, Tapia D, Flores-Barrera E, Reyes A, y Bargas J. (2010). Dopaminergic Modulation of Spiny Neurons in the Turtle Striatum. *Cell Mol Neurobiol*.
- 9.- Barral J, Poblette F, Mendoza E, Pineda JC, Galarraga E, Bargas J (2001). High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal -agatoxin-TK. *Eur J Pharmacol.* 430:167-173. □synapses by
- 10.- Barral, J. 2001. Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatergicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. UNAM. Facultad de ciencias. Iztacala. México DF. Pp 82.
- 11.- Bartol SM, Musick JA, Ochs AL (2002) Visual acuity thresholds of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): an electrophysiological approach. *J Comp Physiol [A]*, 187:953-960.
- 12.- Bear M. F., Connors B.W. y Paradiso M. A. (2001). *Neuroscience: Exploring the Brain*, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, pp 473-482.
- 13.- Bennett DB, y Wilson CJ (2000). Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: *Brain dynamics and striatal complex*, eds. Miller R y Wickens JR, pp 111-140. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- 14.- Bertrand,S; Nouel, D; Morin, F; Nagy, F; Lacaille, JC.( 2003). Gabapentin actions on Kir3 y N-Type Ca<sup>2+</sup> Channels via GABAB receptors in hipocampal pyramidal cells.
- 15.- Bielefield, T; Rotter, JL; Jackson, MB. (1992). Three potassium channels in rat posterior pituitary nerve terminal. *J. Physiol (London)* 458: 41-67.

- 16.- Blanton, M. G, J. J. Lo Turco (1990). "Endogenous neurotransmitter activates N-methyl-D-aspartate receptors on differentiating neurons in embryonic cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(20): 8027-30.
- 17.- Blanton, M. G, J. J. Lo Turco, et al., (1989). "Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex." *J Neurosci Methods*, 30(3): 203-10.
- 18.- Blanton, M. G. and A. R. Kriegstein (1991). "Spontaneous action potential activity and synaptic currents in the embryonic turtle cerebral cortex." *J Neurosci*, 11(12): 3907-23.
- 19.- Bond CT; Maylie J; Adelman JP. 1999. Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Ann NY Acad Sci* 30: 868,370378
- 20.- Butler AB y Hodos W (2005). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation*. 2a. Edición. Hoboken: John Wiley & Sons.
- 21.- Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH (1989) Toxin in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci* 12 (2): 59-65
- 22.- Char-chang S. 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*. 52(4): 557-593.
- 23.- Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience* 3:115-121.
- 24.- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. 1991. Tetraethyl ammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci*. 88 pp 5092-5095.
- 25.- Cingolani He, Houssay AB. 1988. *Fisiología Humana*. 5ta impresión. El ateneo.
- 26.- Coetzee WA; Amarillo Y; Chiu J; Chow A; Lau D; MacCormack T; Moreno H; Nadal MS; Ozaita A; Pountney D; Saganich M; Vega-Saenz de Miera E; Rudy B. (1999). Molecular diversity of potassium channels. *Ann N Y Acad Sci*. 30 (868) 233-285
- 27.- Crouzy S, Berneche S, Roux B. (2001) Extracellular blockade of K<sup>+</sup> channels by TEA: results form molecular dynamics simulation of the KcsA channel. *J Gen Physiol* 118 (207-217)
- 28.- Delgado-Lezama R, Perrier JF, Hounsgaard J (1999) Local facilitation of plateau potentials in dendrites of turtle motoneurons by synaptic activation of metabotropic receptors. *J Physiol*, 515:203-207.
- 29.- Denton JS, and Leiter JC. (2002). Anomalous effects of external TEA on permeation and gating of A-type potassium current in *H. aspersa* neuronal somata. *J. Membrane Biol*. 190, 17-28.
- 30.- Ding L and Perkel D (2002). Dopamine modulates excitability of spiny neurons in the avian basal ganglia. *J Neuroscience*, 22(12): 5210-5218.
- 31.- Dodson, P.D. y Forsythe I.D. (2004). Presynaptic K<sup>+</sup> channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *TRENDS in Neuroscience* 27(4) 220-217.
- 32.- 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) Pp 469-531. Springer-Verlag. Berlin.

- 33.- Faber ES and Sah P (2003) Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist*. 9(3):181-94.
- 34.- 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.
- 35.- Farries MA, Meitzen J y Perkel DJ (2005). Electrophysiological properties of neurons in the basal ganglia of the domestic chick: conservation and divergence in the evolution of the avian basal ganglia. *J. Neurophysiol* 94:454-467.
- 36.- Farries MA, Perkel DJ (2000). Electrophysiological properties of avian basal ganglia neurons recorded In Vitro. *J Neurophysiol*, 84:2502-2513.
- 37.- Farries MA, Perkel DJ (2002). A telencephalic nucleus essential for learning contains neurons with physiological characteristics of both striatum and globus pallidus. *J. of Neuroscience*, 22 (9):3776-3787.
- 38.- Flaherty AW y Graybiel AM (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol*, 66:1249-1263.
- 39.- Gabbiani F, Midtgaard J, Knopfel T (1994) Synaptic integration in a model of cerebellar granule cells. *J Neurophysiol*, 72:999-1009.
- 40.- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández y Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res*, 100: 239-249.
- 41.- Galarraga, E. y Bargas, J. (1998) Multiplicidad de conductancias iónicas en las células excitables. V. 1, Pp 149-166.
- 42.- Gerfen C.R (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci*, 15: 285-320.
- 43.- Gribkoff VK, Starrett JE, Dworetzky SI. (2001). Maxi K potassium channels; form, function, and modulation of endogenous regulators of intracellular calcium. *The Neuroscientist* 7(2) 166-178.
- 44.- Guertin PA, Hounsgaard J (1998) NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol*, 80:3380-3382.
- 45.- Guertin PA, Hounsgaard J (1999) L-type calcium channels but not N-methyl-D-aspartate receptor channels mediate rhythmic activity induced by cholinergic agonist in motoneurons from turtle spinal cord slices. *Neurosci Lett*, 261:81-84.
- 46.- Hammond C (2001). *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2ª Ed. Academic Press. San Diego. Pp. 424-448.
- 47.- Heginbotham L and MacKinnon R (1992) The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8:483-491.
- 48.- Henselmans JM, Hoogland PV y Stoof JC (1991). Differences in the regulation of acetylcholine release upon D2 dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor activation between the striatal complex of reptiles and the neostriatum of rats. *Brain Res*, 566(1-2): 8-12.

- 49.- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier JD, Reyes A y Galarraga E. (1997). D1 receptor activation Enhances evoked discharge in neostriatal médium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J. Neuroscience*. 17(9):3334-3342.
- 50.- Hille B (1994) Modulation of ion-channels function by G-protein- coupled receptors. *Trends Neurosci*.17(12):531-536.
- 51.- Hille, B. (1967). The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J. Gen. Physiol*. 50:1287-1302.
- 52.- Hille. B. (2001). *Ion channels of excitable Membranes*. Third edition. Sinauer associates INC publisher.
- 53.- Hodgkin A. y Huxley A. F. 1952, A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve., *J. Physiol (London)* 117:500-544
- 54.- Hounsgaard J (2002) Motoneurons do what motoneurons have to do. *J Physiol*, 538:400.
- 55.- 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.
- 56.- Jan L and Jan Y (1997) Voltage- gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Phtsiol* 505:267-282.
- 57.- Jarolimek V. Bäurle J. Misgeld U. 1998. Pore mutation in a G-protein- gated Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit causes loss of K<sup>+</sup> -dependent inhibition in weaver Hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 18 (11) 4001-4007.
- 58.- Jones, SPV. 1997, Gradual modulation of an Inwardly rectifying potassium conductance. *Neuropharmacology* 36(2): 209-215
- 59.- Kaczorowsky GJ. García ML.1999. Pharmacology of voltage-gated and calcium activated potassium channels *Chemical biology* 3: 448-458.
- 60.- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000). *Principles of Neural Science*. 4a Ed. McGraw-Hill USA. Pp. 175-298.
- 61.- Kawagushi, T. (1993) Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci*. 13: 4908-4923.
- 62.- Keifer J, Vyas D, Houk JC, Berrebi AS, Mugnaini E (1992) Evidence for GABAergic interneurons in the red nucleus of the painted turtle. *Synapse*, 11:197-213.
- 63.- Kiehn O, Rostrup E, Moller M (1992) Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. *J Comp Neurol*, 325:527-547.
- 64.- Kröner S, Gottmann K, Hatt H, Güntürkün O (2002) Electrophysiological and morphological properties of cell types in the chick neostriatum caudolaterale. *Neurosci*, 110:459-473.
- 65.- Lange KW, Kornhuber J, Riederer P (1997). Dopamine/Glutamate Interactions in Parkinson's Disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 21(4):393-400.

- 66.- Louis E, Degli Esposti Boschi C, Ortega G, Andreu E, Fernandez E, Sanchez-Andres JV (2002) Effects of fluctuations on electrical properties of gap-junction connected cells in the turtle retina. *Neurosci Lett*, 323:21-24.
- 67.- Lovinger, D.M. y E. Tyler. (1996) Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Int. Rev. Neurobiol.* 39:77-111.
- 68.- Luo M y Perkel (1999). Long-Range GABAergic Projection in a circuit essential for vocal learning. *J. Comparative Neurology* 403:68-84.
- 69.- MacKinnon R and Yellen G. (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science*. 250:276-279.
- 70.- Magill PJ, Bolam P y Bevan MD (2000). Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci*,20: 820-833.
- 71.- Marin O, Smeets W, González A (1997). Basal ganglia organization in amphibians: catecholaminergic innervation of the striatum and nucleus Accumbens. *J. Comp.Neurol*, 378:50-69.
- 72.- Marin O, Smeets W, González A (1998). Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS*, 21:487-494.
- 73.- McDonagh JC, Gorman RB, Gilliam EE, Hornby TG, Reinking RM, Stuart DG (1999) Electrophysiological and morphological properties of neurons in the ventral horn of the turtle spinal cord. *J Physiol Paris*, 93:3-16.
- 74.- Medina L, Reiner A. (1995). Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: implications for the evolution of the basal ganglia. *Brain Behav Evol*, 46: 235-258.
- 75.- Medina L, Reiner A. (1997). The efferent projections of the dorsal and ventral pallidal parts of the pigeon basal ganglia, studied with biotinylated dextran amine. *Neuroscience*, 81: 773-802.
- 76.- Meir A., Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S, Rahamimoff R. (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* 79, 1019-1088.
- 77.- Merves H and Pichan Y (1977) The effect of internal and external external 4-aminopyridine on the potassium currents in intracellularly perfused squid giant axons. *J. Physiol.* 268:511-532.
- 78.- Miller, C. (1995). The Charybdotoxin Family of K<sup>+</sup> Channel-Blocking Peptides. *Neurona*, 15:5-10.
- 79.- Muñoz MD, Gaztelu JM. y Austtb EG. (1998). Homo- and heterosynaptic long-term potentiation in the medial cortex of the turtle brain in vitro. *Brain Research*. 807: 155 – 159.
- 80.- Nicholls CG and Lopatin AN. (1997) Inward Rectifier Potassium Channels. *Ann. Rev. Physiol.* 59:171-191.
- 81.- Nicola S.M, Surmeier D.J y Malenka R.C (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*, 23: 185-215.

- 82.- 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.
- 83.- Nisenbaum ES y Wilson CJ (1995). The role of potassium currents in the subthreshold responses of neostriatal spiny projection neurons. En: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 165-181. Austin, TX: Landes.
- 84.- Nisenbaum ES, Xu CZ y Wilson CJ. (1994). Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurophysiology.* 71(3):1174-1189.
- 85.- Northcutt RG. (1981). Evolution of the telencephalon in non-mammals. *Ann Rev Neurosci*, 4:301-350.
- 86.- Pérez-Garci E. (2003). Caracterización de la modulación del patrón de disparo de la neurona espinosa mediana del neostriado, por la activación del receptor dopaminérgico tipo D2. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 86 pp.
- 87.- Pérez-Garci E. Bargas J. y Galarraga E. (2003). The role of Ca channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *J Neuropharmacology* 14:9, 1253-1256.
- 88.- Perkel DJ, Farries MA, Luo M y Ding L (2002). Electrophysiological Analysis of a songbird basal ganglia circuit essential for vocal plasticity. *Brain Research Bulletin* 57:529-532.
- 89.- Perrier JF, Hounsgaard J (1999) Ca<sup>2+</sup>-Activated nonselective current (ICAN) in turtle motoneurons. *J Neurophysiol*, 82:730-735.
- 90.- Phil. C. Biggin; Tarmo, Roosild; Senyon Choe. 2000. Potassium channel structure: domain by domain. *Structural biology.* 10: 456-461 *Physiology.* Fourth Edition. Willy-liss Publication
- 91.- Pough FH, Janis CM, Heiser JB. (1999). *Vertebrate life*, 5 Edition: Prentice Hall.
- 92.- Powers AS, Reiner A. (1980) A stereotaxic atlas of the forebrain and midbrain of the eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). *J Hirnforschung* 21:125-159.
- 93.- Redgrave P, Prescott T. y Gurney K. (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem?. *Neuroscience*, 89:1009-1023.
- 94.- Reimann f, Ashcroft. 1999. Inwardly rectifying potassium channels. *Cell biology.* 11: 503-508.
- 95.- Reiner A, Brauth SE, Karten HJ. (1984). Evolution of the amniote basal ganglia. *TINS*, 7:320-325.
- 96.- Reiner A, H. J. Karten y A.R Solina (1983) Substance P: Localization within paleostriatal-tegmental pathways in the pigeon. *Neurosci*, 0:61-85.
- 97.- Reiner A, Medina L, Veenman CL. (1998). Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev*, 28:235-285
- 98.- Reyes A, Galarraga E, Flores-Hernandez J, Tapia D y Bargas J. (1998). Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp. Brain Res.* 120:70-84.

- 99.- Sanchez-Mejorada E, Sanchez-Mondragon G, Pineda JC, Gonzalez M y Barral J. (2009) N-type calcium channels mediate a GABAB presynaptic modulation in the corticostriatal synapse in turtle's paleostriatum augmentatum. *63(10):855-62.*
- 100.- Shen, JM and. Kriegstein AR (1986). "Turtle hippocampal cortex contains distinct cell types, burst-firing neurons, and an epileptogenic subfield." *J Neurophysiol, 56(6): 1626-49.*
- 101.- Shepherd GM (2004). *The Synaptic Organization of the Brain. 5ª Ed. Oxford University Press. USA. Pp. 1-38, 361-413.*
- 102.- Smeets W, Marín O. y González A. (1999). Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anal.*
- 103.- Smeets y Reiner A. (1994). Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. *Cambridge University Press. pp. 103 – 128.*
- 104.- Smith Y.; M.D. Devan; E, Shink y J.P Bolam. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience 86:353-387.*
- 105.- Smith-Nielsen T. 1997. *Animal physiology. Adaptation and environment. Fifth Edition. Cambridge University press.*
- 106.- Stanfield PR (1983) Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 97:1-67.*
- 107.- Striedter GF. (1997). The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol, 49:179-213.*
- 108.- Striedter GF. (2005.). *Principles of Brain Evolution. Ed. Sinauer Associates inc. USA. P. 433.*
- 109.- Sugimori M, Preston RJ y Kitai ST. (1978). Response properties and electrical constants of caudate nucleus neurons in the cat. *J. Neurophysiology, 41:1662-1675.*
- 110.- Surmeier DJ, Song WJ, y Yan Z (1996). Coordinated Expresión of dopamine receptors in neostriatal neurons. *J Neurosci, 16: 6579-6591*
- 111.- Takako O-S, Kim I, Sawada S, Yamamoto C. (1996). Presence of the voltage-gated potassium channels sensitive to charybdotoxin inhibitory presynaptic terminals of cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters 207 (195-198).*
- 112.- Tan YP and Llano I. (1999). Modulation by K<sup>+</sup> channels of action potential-evoked intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration rises in rat cerebellar basket cell axons. *Journal of physiology 520 (1) 65-78.*
- 113.- Thorn PJ, Wang XM, Lemos JR. (1991). A fast, transient K<sup>+</sup> current in neurohipophysial nerve terminal of rat. *J Neurophysiol.432*
- 114.- Venance L and Glowinski J (2003) Heterogeneity of spike frequency adaptation among medium spiny neurones from the rat striatum. *Neurosci, 122: 77-92.*
- 115.- Vitanova L, Kuppenova P, Haverkamp S, Popova E., Mitova L. y Wassle H (2001) Immunocytochemical and electrophysiological characterization of GABA receptors in the frog and turtle retina. *Vision Res, 41:691-704.*

- 116.- Wang, H; Pan, Z; Shi, W; Brown, BS; Wymore, RS; Cohen, IS; Dixon, JE; Mckinnon D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channels subunits: Molecular correlates of the M-channel. *Scien.* 282: 1890-1983.
- 117.- Wilson (2004). The Basal ganglia. En: The synaptic organization of the brain. Shepherd. 5<sup>a</sup> Ed. Oxford University Press. USA. 719 págs.
- 118.- Wilson, C. (1998). The Basal Ganglia. In: Shepherd, G.M. (Ed) The synaptic organization of the brain. 4<sup>a</sup> Ed. Oxford University press. N.Y. pp 329-375.
- 119.- Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. (2001). Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv 1.4 potassium channels by a voltage dependent-oxidative mechanism. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 299(1) 227-237.
- 120.- 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.