



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Modificación de los patrones de disparo de Neuronas  
Espinosas Medianas por el bloqueo de canales  
iónicos en el estriado dorsolateral de la tortuga  
*Trachemys scripta elegans.***

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

Presenta:

**Héctor Aarón Vázquez Vázquez**

Número de Cuenta: 309334176

Correo electrónico: hecvazquez93@gmail.com



**Vo. Bo. DR. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO**

Tutor

-- 2016--

Los Reyes, Iztacala, Estado de México



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo Proyectos a Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [Proyecto IN213310]** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**. Así como del **Fondo de Investigación Científica Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [Proyecto 167147]** al **Dr. Jaime Barral**.

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias** en la **Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (U.I.I.C.S.E.)** de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo de Julio de 2014 a Abril de 2016.

Se agradece al **Programa de Vinculación con los Egresados de la UNAM** por el apoyo económico otorgado para la conclusión del presente trabajo de tesis.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del

**Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.**

**Proyecto Neurociencias U.I.I.C.S.E. FES Iztacala UNAM.**

2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Quiero dar las gracias a mis sinodales por sus comentarios para mejorar este trabajo.

Al Dr. Jaime Barral le agradezco todo el tiempo, dedicación y apoyo que me brindo durante la realización de todo el trabajo, también le agradezco la amistad que me ha brindado durante todo este tiempo.

A mis amigos Luis, Gabriel, Edwin, Jess, Jocelyn, quienes siempre han dado su apoyo desde que los conocí, les agradezco por todo y espero que a pesar del tiempo continué nuestra amistad.

A mis compañero, pero también amigos, del laboratorio de Electrofisiología Caro, Ángel, Raúl y Gus, con quienes pasé mucho tiempo mientras realizaba el trabajo y quienes me vieron sufrir pero también me dieron su apoyo, les agradezco por el apoyo y por las risas durante todo el trabajo.

A toda mi familia le agradezco que siempre tenido confianza en mí y por todo el apoyo brindado.

Doy gracias a todos los sacrificios que hicieron mis abuelos por mis papás, ya que gracias a esos sacrificios es que yo he lograr cumplir todos mis propósitos.

A mi hermano, gracias por todo lo que has hecho por mí y por el apoyo que siempre me has dado, te lo agradezco mucho.

Pero a las dos personas que más agradezco es a mi mamá y a mi papá, gracias por su apoyo, paciencia, cariño, gracias por todo. Los quiero y siempre voy a agradecer el esfuerzo que han hecho para ayudarme a llegar a este punto.

**¡GRACIAS!**

# Índice

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
GANGLIOS BASALES .....	2
Evolución de los Ganglios Basales .....	5
Núcleo estriado .....	8
Neuronas espinosas medianas .....	8
CANALES IÓNICOS .....	12
Canales de Calcio .....	14
Estructura general de los canales de calcio .....	14
Canales de calcio de alto umbral (HVA) .....	17
Canales tipo L (Ca <sub>v</sub> 1) .....	18
Canales tipo P/Q (Ca <sub>v</sub> 2.1) .....	18
Canales tipo N (Ca <sub>v</sub> 2.2) .....	18
Canales tipo R (Ca <sub>v</sub> 2.3) .....	18
Canales de calcio de bajo umbral (LVA) .....	19
CANALES DE CALCIO PRESENTES EN NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS .....	19
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVOS .....	20
MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
RESULTADOS .....	24
Caracterización electrofisiológica de las NEM el estriado de rata y de tortuga .....	24
Bloqueo inespecífico de canales de Ca <sup>2+</sup> mediante la aplicación de Cd <sup>2+</sup> .....	28
Bloqueo de canales de Ca <sup>2+</sup> mediante la aplicación de Ni <sup>2+</sup> .....	29
Contribución de canales tipo L (Ca <sub>v</sub> 1) al patrón de disparo de las NEM .....	33
Papel de los canales tipo N (Ca <sub>v</sub> 2.2) en el patrón de disparo de las NEM .....	35
Participación de los canales tipo P/Q (Ca <sub>v</sub> 2.1) en el patrón de disparo de las NEM .....	39
DISCUSIÓN .....	42
Bloqueo de canales de calcio por medio de cadmio .....	43
Identificación de canales Ca <sup>2+</sup> mediante bloqueo farmacológico con níquel .....	44
Contribución de canales tipo L (Ca <sub>v</sub> 1) al patrón de disparo de las NEM .....	46
Papel de los canales tipo P/Q (Ca <sub>v</sub> 2.1) y N (Ca <sub>v</sub> 2.2) en el patrón de disparo de las NEM ..	47
CONCLUSIONES .....	50
LITERATURA CITADA .....	51

## RESUMEN

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales que se encuentran involucrados en varios procesos como lo son las funciones motoras, cognoscitivas y mnemónicas. En los amniotas modernos los ganglios basales son muy similares, lo que hace pensar que la evolución de dichas estructuras en los cordados es altamente conservada. Dentro de los ganglios basales se encuentra el núcleo estriado en donde el 95% de la población neuronal está conformado por las Neuronas espinosas medianas de proyección; sin embargo a pesar de ser estructuras conservadas, es posible que existan diferencias electrofisiológicas en las neuronas espinosas medianas de los grupos más antiguos de cordados, debido a las diferentes adaptaciones que han sufrido estos grupos durante la evolución. Por tanto el propósito de este trabajo consistió en describir como el patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas del estriado dorsolateral de la tortuga (*Trachemys scripta elegans*), se modifica por bloqueo de los canales de iónicos, específicamente canales de calcio dependientes de voltaje. Para lo cual se realizó la técnica de registro electrofisiológico Patch-Clamp en modalidad Whole-Cell, todas las neuronas registradas se mantuvieron a un potencial de membrana de -80 mV y se mandaron pulsos cuadrados de corriente para posteriormente realizarse los protocolos de curvas I/V e I/F para caracterizar la actividad de las neuronas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que las propiedades electrofisiológicas que caracterizan a las neuronas espinosas medianas en mamífero también se encuentran presentes en las tortugas, sugiriendo que estas propiedades se han conservado a la largo de la evolución de los cordados. En relación a la contribución de los canales de calcio a la generación del patrón del disparo de las neuronas espinosas medianas los resultados arrojaron que el bloqueo de calcio tipo L mediante nifedipina redujo la frecuencia de disparo así como la meseta de disparo mientras que la activación BayK-8644 de estos modificó el patrón de disparo de un disparo regular a un disparo en mesetas; en cuanto a los canales tipo N y P/Q se observó que a diferencia de lo reportado para mamíferos, en la tortuga el cambio en la frecuencia de disparo y en la amplitud del postpotencial hiperpolarizante está controlado únicamente por los canales P/Q, debido a que el bloqueo de estos canales mediante agatoxina produjo cambios significativos en la frecuencia de disparo y amplitud postpotencial hiperpolarizante, mientras que el bloqueo de canales tipo N mediante conotoxina no produjo diferencias significativas en la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas, asimismo los resultados del bloqueo farmacológico con niquel sugieren que en esta estirpe neuronal es posible que existan canales de calcio tipo T y/o R.

**Palabras clave:** Ganglios basales, estriado, neuronas espinosas medianas, tortuga, canales de calcio, patrón de disparo.

## INTRODUCCIÓN

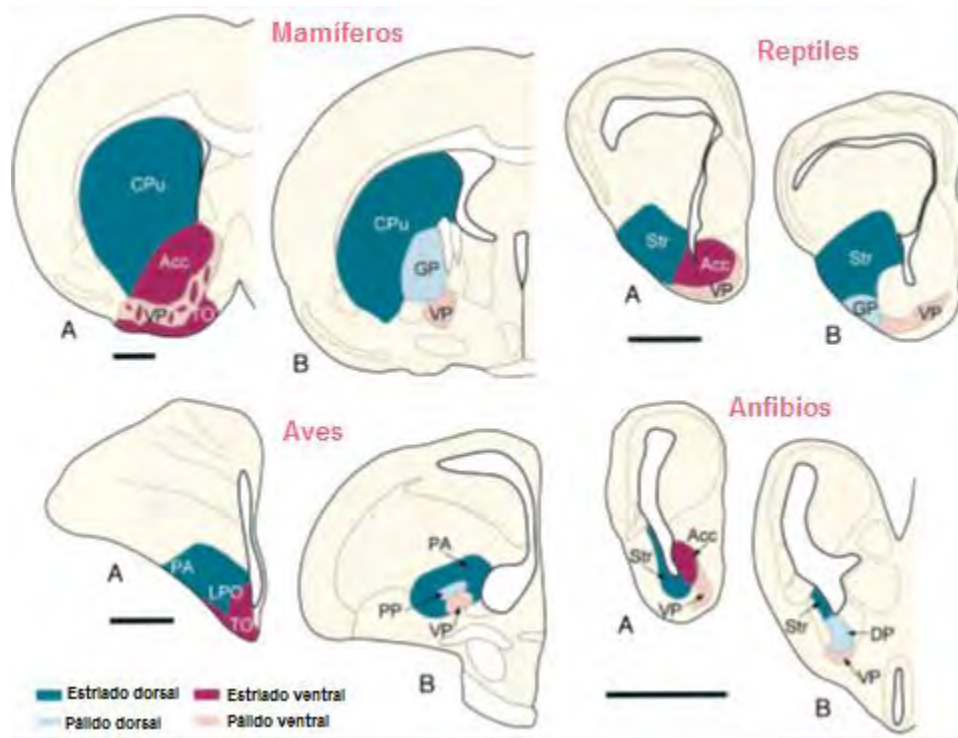
### GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos cerebrales, altamente interconectados, que se encuentran ubicados en el prosencéfalo y mesencéfalo de anamniotas y amniotas [Wilson, 2001; Reiner, *et al*, 1998]. En ambos grupos se ha observado que las diferentes estirpes celulares, la conectividad interregional y el control genético del desarrollo de las regiones de los ganglios basales presentan una gran similitud, lo que sugiere que la evolución de estos ha sido altamente conservada [Reiner, 2010]. Asimismo se sabe que los GB realizan importantes funciones tanto motoras como no motoras, relacionadas con el comportamiento [Marín *et al*, 1998].

En relación a la organización estructural de los GB, diversos estudios han mostrado que en todos los tetrápodos presentan una organización similar y se encuentran formados por los mismos núcleos, o bien por núcleos homólogos. Los núcleos principales son: la sustancia nigra, el área ventral tegmental, el núcleo subtalámico, así como el sistema estriatopalidal dorsal, formado por el estriado dorsal o estriado (putamen y núcleo caudado o caudado-putamen), el globo pálido externo e interno; y el sistema estriatopalidal ventral formado por estriado ventral (núcleo accumbens y parte del bulbo olfatorio) y el pálido ventral [Marín *et al*, 1998] (figura 1).

Dentro del circuito que conforman los GB, la principal entrada de información proviene de las neuronas piramidales glutamatérgicas de las capas V y VI de la corteza cerebral, así como de las capas II-III [Paxinos, 2015], también reciben aferencias del tálamo y la amígdala. Las aferencias a los GB realizan sinapsis con las neuronas espinosas medianas del neostriado [Gerfen y Bolam, 2010; Paxinos, 2015]. Las neuronas espinosas medianas (NEM) son las principales neuronas de proyección de este núcleo, y también reciben aferentes dopaminérgicas de la sustancia nigra, aferentes GABAérgicas de axones colaterales de otras neuronas espinosas medianas o de interneuronas estriatales y

aferentes de interneuronas estriatales colinérgicas. Estas entradas que llegan al estriado tienen la función de modular o regular la sensibilidad de las neuronas espinosas medianas a los estímulos excitatorios que llegan al estriado [Gerfen y Bolam, 2010] (figura 2).

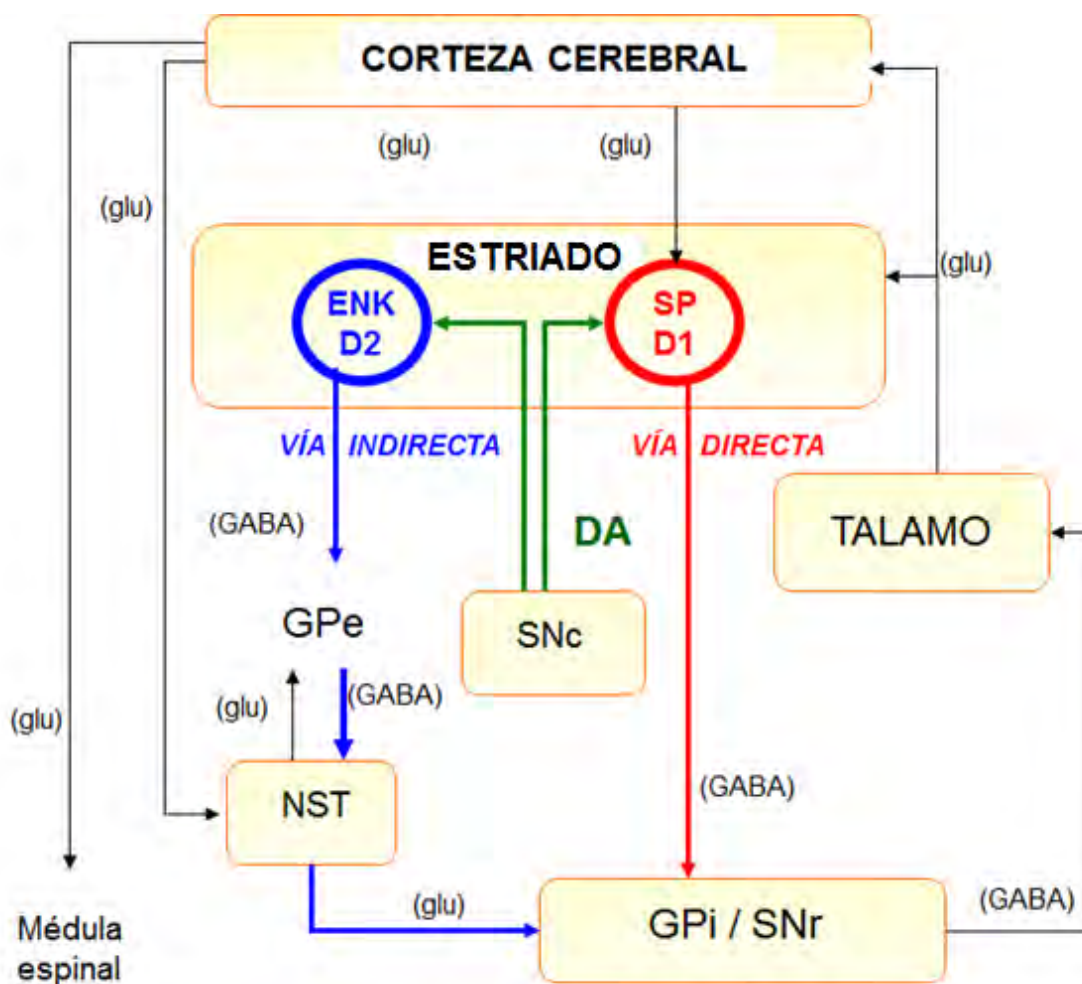


**Figura 1. Sistema estriatopalidal dorsal y ventral en todos los tetrápodos.** Se muestran dos cortes coronales (A. Rostral, B. Caudal) en los cuales se observa la posición relativa de las estructuras estriatales y palidales. (PA: paleostriatum augmentatum (actualmente Estriado dorsolateral). LPO: lóbulo paraolfatorio. TO: bulbo olfatorio. Acc: núcleo accumbens. Str: estriado. VP: pálido ventral. DP: pálido dorsal. GP: globo pálido. CPu: caudado-putamen) [Tomado de Marín et. al, 1998].

Los principales núcleos de salida de los GB son: 1) núcleo talámico, que proyecta a áreas corticales frontales relacionadas con la planeación y ejecución del movimiento; 2) núcleo intralaminar talámico, el cual proyecta hacia corteza y estriado; 3) capas intermedias del colículo superior, involucradas en la generación del movimiento de los ojos y cabeza; y 4) núcleos pedúnculo pontinos, relacionado con la orientación de los movimientos del cuerpo [Gerfen y Bolam, 2010; figura 2].

Las NEM forman dos vías independientes, más o menos bien definidas, adonde proyectan sus axones; estas se conocen como la vía directa y la indirecta [figura 2 y 3]:





**Figura 2. Circuito de los ganglios basales.** Como se puede ver, el estriado recibe aferencias de la corteza y del tálamo, asimismo recibe aferencias de la sustancia nigra pars compacta (SNc), así como de interneuronas propias del neostriado [Modificado de Gerfen, 2006].

A) En la vía directa las neuronas de proyección del estriado (neuronas espinosas medianas), mandan sus axones colaterales hacia el globo pálido externo en el cual estos no se arborizan, y envían otros axones colaterales hacia el globo pálido interno y/o la sustancia nigra reticulata. De esta manera la vía directa desinhibe al tálamo y esto conduce a un incremento de la actividad motora. Una de las principales características que presentan las neuronas de proyección del estriado de esta vía es que expresan receptores dopaminérgicos de la familia tipo D1 (receptores D1 y D5), así

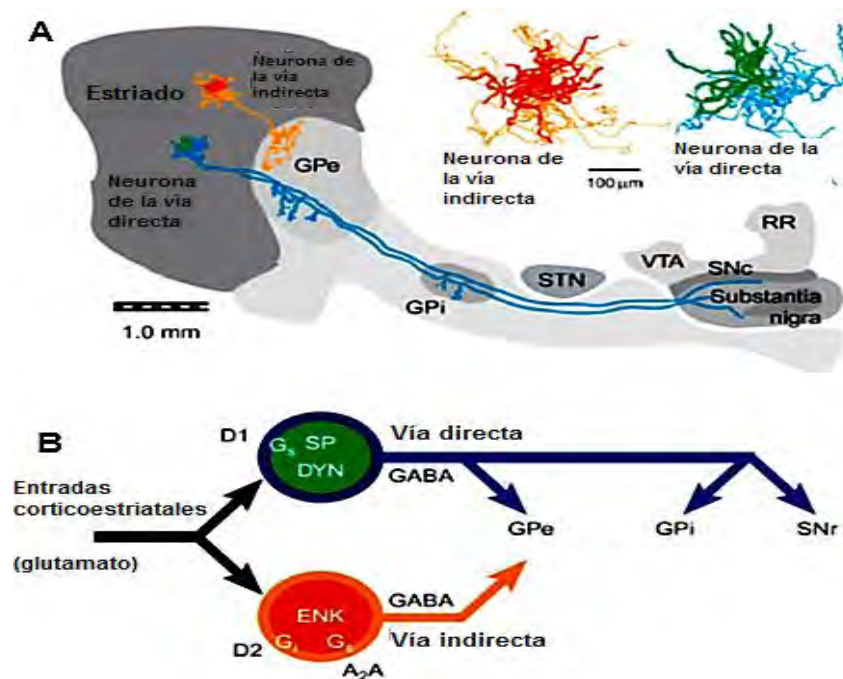
como para sustancia P (SP) y dinorfinas. [Wilson, 2001; Gerfen y Bolam, 2010].

B) En la vía indirecta las neuronas de proyección envían sus axones hacia el globo pálido externo, el cual manda proyecciones hacia el núcleo subtalámico, y este último se proyecta hacia el globo pálido interno y la sustancia negra pars reticulata. De este modo esta vía incrementa la inhibición del tálamo y por tanto provoca una disminución de la actividad motora. En esta vía las neuronas de proyección del estriado se caracterizan por expresar receptores dopaminérgicos de la familia tipo D2 (Receptores D2, D3, y D4), así como para encefalinas (ENK). De este modo esta vía incrementa la inhibición del tálamo y por tanto provoca una disminución de la actividad motora [Wilson, 2001; Gerfen y Bolam, 2010].

### **Evolución de los Ganglios Basales**

Como se mencionó anteriormente, los ganglios basales presentan una gran similitud en anamniotas y amniotas, sugiriendo que la aparición de dichos núcleos sucedió muy temprano en la evolución de los vertebrados [Reiner et al., 1984; 1998; 2010].

En el caso de los ciclóstomos se ha observado que estos poseen las características generales que definen a los ganglios basales; así mismo se ha visto que mantienen los componentes estriatales y palidales y las características celulares y neuroquímicas que los definen. Específicamente se ha observado que el núcleo estriado de estos organismos comparte muchas similitudes con los demás grupos de vertebrados, como lo es la presencia de las NEM, las cuales conservan la mayor parte de las características que se han observado en mamíferos y que serán descritas más adelante [Reiner, 2007; Stephenson-Jones et. al., 2011, 2012; Ericsson, 2013; Grillner, 2013].



**Figura 3. Vías directa e indirecta de los GB.** A: Esquema en el que se muestran las proyecciones y los núcleos a las que llegan en la vía directa e indirecta. B: Se muestran las características de las neuronas de proyección de cada una de las vías. GPe: Globo pálido externo, GPi: globo pálido interno, STN: núcleo subtalámico, VTA: área tegmental ventral, SNc: sustancia nigra compacta, RR: área retrorubral, SP: sustancia P; DYN: dinorfinas, ENK: encefalina [Modificado de Gerfen y Bolam, 2010].

En grupos de peces como los condriicties y los osteictios, se ha notado que mantienen las características anatómicas y celulares descritas en los mamíferos; sin embargo, el grado de especialización que presentan estos grupos en sus ganglios basales es muy pobre, ya que probablemente no necesitan de tanta precisión para llevar a cabo el control de los movimientos debido a que el movimiento que realizan estos organismos se genera como un reflejo espinal [Reiner, et.al. 1998; Reiner 2007, 2010].

La especialización en la función de los ganglios basales para llevar a cabo el control de los movimientos se da en el momento de la transición del medio acuático al medio terrestre, ya que el movimiento comienza a darse no sólo como un reflejo espinal, sino que comienzan a utilizarse las aletas (como en el caso de los sarcopterigios) o las extremidades, esta conducta se puede observar en anfibios como lo son los urodelos. En todos los casos mencionados, se puede

suponer que estas conductas motoras están siendo reguladas o controladas por el circuito que se presenta en los ganglios basales, el cual ha comenzado a adquirir un mayor grado de complejidad [Reiner, 2010; Endepols, et. al. 2007; Maier, et. al. 2010].

Sin embargo, probablemente el mayor avance evolutivo en relación a la locomoción, y al control del movimiento por los ganglios basales, se da en la transición de amniotas a anamniotas, es decir, en el cambio de anfibios a reptiles. En este último grupo el control del movimiento mediante los ganglios basales se vuelve mucho más fino y controlado, debido a que la locomoción está dada completamente por las extremidades, cuestión por la cual a partir de los reptiles se puede observar que los componentes estriatales y palidales de los ganglios basales aumentan en su tamaño así como en el número y tipo de conexiones neuronales con lo cual se hace evidente el incremento en el grado de especialización de estos. Las evidencias sugieren que a partir de este grupo de vertebrados todas las funciones que llevan a cabo los ganglios basales en los tetrápodos actuales se hacen presentes [Marín *et. al.*, 1998; Reiner, 2007, 2010].

Otro de los grandes avances evolutivos de los ganglios basales se dio con la aparición de las aves y los mamíferos; en estos grupos las funciones de los ganglios basales se especializan aún más y se da mayor incremento en el tamaño de los ganglios basales. El aumento en el tamaño de los ganglios basales es notable en los mamíferos, este incremento en los ganglios basales puede deberse al hecho de que en este grupo las extremidades tienen múltiples funciones además de dotar de movilidad al organismo, para lo cual debe haber un mayor control del movimiento, por lo que el desarrollo de los componentes estriatales y palidales tuvo gran importancia en este grupo; igualmente la función que desarrollan este grupo de núcleos subcorticales en cuestiones del comportamiento comienza a tomar una mayor importancia en los mamíferos, lo cual también podría explicar el aumento del volumen de los ganglios basales, así como de las conexiones neuronales presentes en los mamíferos [Marín *et. al.*, 1998; Reiner, 2002, 2007, 2010].

## **Núcleo estriado**

El núcleo estriado se encuentra formado por diferentes estirpes neuronales entre las que se destacan las NEM las cuales componen el 95% o más de la población neuronal del estriado, siendo las neuronas de proyección de este núcleo, y se encuentran distribuidas de manera homogénea en todo el estriado. La población neuronal restante se conforma por interneuronas, que se dividen principalmente en tres grupos [Reiner *et. al*, 1998; Wilson, 2001; Gerfen y Bolam, 2010]:

- 1) Interneuronas colinérgicas gigantes: expresan la enzima acetilcolinesterasa; dentro del estriado son las interneuronas de mayor tamaño (50-60  $\mu\text{m}$  de diámetro). Presentan dendritas lisas o ligeramente espinosas.
- 2) Interneuronas inmunoreactivas a parvalbúmina: estas son de naturaleza GABAérgica y expresan la enzima quelante de calcio parvalbúmina, tienen un diámetro de 10-30  $\mu\text{m}$ . Sus dendritas son lisas en las regiones proximales y presentan varicosidades en las zonas más distales del soma.
- 3) Interneuronas somatostatinérgicas: liberan somatostatina (SS) y también expresan la enzima óxido nítrico-sintetasa, son de tipo bipolar y tienen un diámetro de 10-20  $\mu\text{m}$ . Sus dendritas son lisas y rara vez presentan ramificaciones.

## **Neuronas espinosas medianas**

Las neuronas espinosas medianas son el tipo neuronal más abundante del estriado. Estas neuronas utilizan GABA como neurotransmisor, proyectan hacia el globo pálido y la sustancia nigra, y reciben tanto entradas excitatorias (glutamatérgicas) como entradas inhibitorias (GABAérgicas). Por otro lado, en el animal integro éstas neuronas requieren de una gran despolarización por parte de las aferencias corticales para poder iniciar potenciales de acción debido a que su potencial de membrana en el reposo está hiperpolarizado ( $-67\text{ mV}$ ) [Nisenbaum, 1992; 1995; Hammond, 2008).

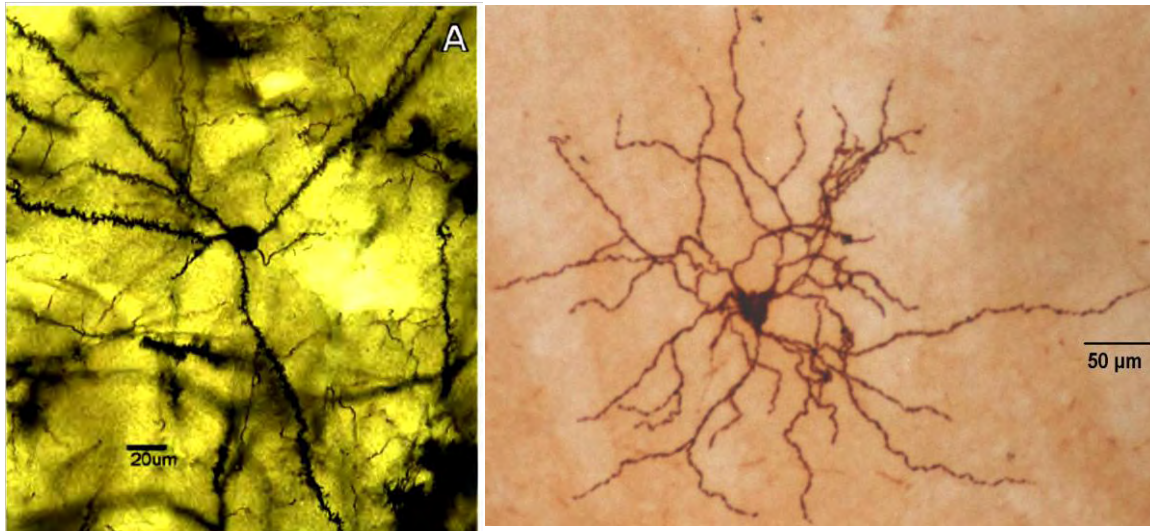
Las neuronas de proyección se hallan en el estriado de todos los grupos de vertebrados estudiados, por tanto puede suponerse que las características tanto morfológicas como electrofisiológicas de estas neuronas en diferentes grupos de vertebrados se haya conservado a lo largo de la evolución de los ganglios basales.

Aunque existen muy pocos estudios realizados en tortuga (*Trachemys scripta elegans*), dichos estudios muestran que hay una gran similitud morfológica [Gonzalez et al., 2013] y funcional [Sanchez-Mejorada, et al., 2009; Barral et al., 2010] entre las neuronas de proyección de mamíferos y reptiles vertebrados. Las NEM de tortuga presentan un diámetro del soma de 15-18  $\mu\text{m}$ , típicamente presentan de tres a cuatro troncos dendríticos primarios (los cuales surgen aleatoriamente alrededor del soma) y pueden bifurcarse en dendritas secundarias y terciarias; la densidad de las espinas presentes en las dendritas se incrementa conforme el tronco dendrítico se aleja del soma pero en la parte final de éste la densidad de las espinas disminuye; la longitud promedio de las dendritas es de alrededor de 175  $\mu\text{m}$  el axón de estas neuronas emerge del soma o de una dendrita cercana al segmento proximal de la dendrita primaria y tienen un diámetro de 1.3  $\mu\text{m}$  [González et al., 2013; figura 4].

Las propiedades electrofisiológicas que presentan las NEM de reptiles y mamíferos son muy similares [Barral et. al, 2010]. Las características que comparten las neuronas de estos grupos son: 1) potencial de membrana de entre -80 y -60 mV [Hernández-López et. al, 1997]; 2) corrientes rectificadoras de  $\text{K}^+$  de dos tipos: la primera es una corriente rectificadora anómala ( $\text{K}_{ir}$ ) que se activa a potenciales hiperpolarizados (aproximadamente a -80 mV) impidiendo que el potencial de la membrana se vuelva más negativo, y la segunda corriente es una corriente rectificadora entrante ( $I_A$ ) la cual se activa a partir de los -60 mV favoreciendo que el potencial de membrana se estabilice en valores subumbrales o impidiendo que éste se haga más positivo, y produciendo retraso en la aparición del disparo a estímulos depolarizantes; 3) asimismo estas neuronas exhiben un proceso de adaptación o adecuación en la frecuencia de disparo; 4) Otra de las características electrofisiológicas que presentan las NEM es la presencia del

postpotencial hiperpolarizante (PPH) que se produce durante los disparos repetitivos de las neuronas, dicho postpotencial es generado por la activación de canales de potasio dependientes de calcio (canales BK y SK), los cuales se activan cuando ocurre un incremento en la concentración intracelular de calcio (figura 5) [Nisenbaum *et al.*, 1995; Barral *et al.*, 2010; Berkefeld, *et al.*, 2010; Luján, 2010; Arias-García *et al.*, 2013]

---

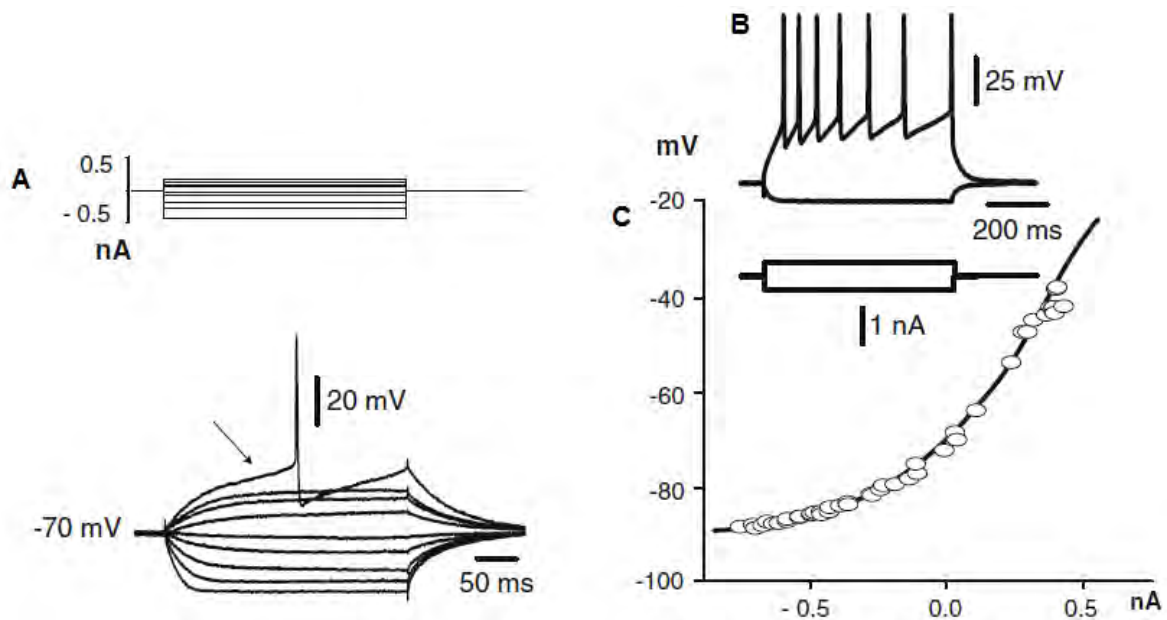


**Figura 4. Microfotografía de NEM de tortuga teñida por el método de Golgi (izquierda) [Modificado de González *et al.*, 2013] y de mamífero teñida por medio de biocitina (derecha).**

---

El PPH presenta dos componentes: el postpotencial hiperpolarizante rápido (PPH<sub>R</sub>) el cual es generado principalmente por los canales BK, y el postpotencial hiperpolarizante lento (PPH<sub>L</sub>) producido por los canales SK [Hille, 2001].

El PPH<sub>R</sub> tiene importantes implicaciones en la repolarización de la membrana durante el potencial de acción y en la regulación del intervalo interespiga. El PPH<sub>R</sub> tiene una duración aproximada de 1-10 ms, lo cual se debe a que los canales BK se activan rápidamente durante el potencial de acción y se cierran igualmente rápido cuando la membrana regresa a potenciales negativos [Hille, 2001; Faber y Sah, 2003; figura 6].



**Figura 5. Características electrofisiológicas de las NEM de tortuga.** A: Se observa el retraso en la aparición del primer disparo en respuesta a pulsos cuadrados de corriente. B: Proceso de adaptación de la frecuencia del disparo, se puede notar que hay una mayor frecuencia al inicio del estímulo y que esta disminuye con el tiempo. C: Curva I/V en la que se puede observar la rectificación entrante características de las NEM [Tomado de Barral *et. al.*, 2010].

El  $PPH_L$  tiene dos funciones principales: limita la frecuencia de disparo y es responsable de la generación de la adaptación de la frecuencia de disparo; este componente tiene una duración aproximada de 50-100 ms [Hille, 2001; Faber y Sah, 2003]. A su vez en el  $PPH_L$  pueden distinguirse dos componentes: el postpotencial hiperpolarizante medio ( $PPH_m$ ) y el postpotencial hiperpolarizante lento ( $PPH_l$ ), los cuales pueden estar presentes en la misma neurona, o solamente presentar uno u otro de los componentes del  $PPH_L$  [figura 6].

El  $PPH_m$  no presenta contribuciones importantes en la repolarización de la membrana; sin embargo, cuando se expresa solo este componente las neuronas disparan tónicamente y presentan una disminución de la frecuencia máxima de disparo; en contraste, cuando se expresan tanto el componente  $PPH_m$  y  $PPH_l$ , el primero únicamente controla la frecuencia de disparo de las interespigas tempranas [Faber y Sah, 2003; Vogalis, *et. al.* 2003; figura 6].



El PPH<sub>i</sub> es el responsable de la adaptación de la frecuencia del disparo; la presencia de este componente en las neuronas conduce a una disminución progresiva de la frecuencia de descarga de las neuronas y eventualmente al cese de los potenciales de acción, así mismo la presencia del PPH<sub>i</sub> permite que exista un gran control en las propiedades de disparo en las neuronas en las que se expresa este componente del PPH<sub>L</sub> [Faber y Sah, 2003; Vogalis, *et. al.* 2003; figura 6].

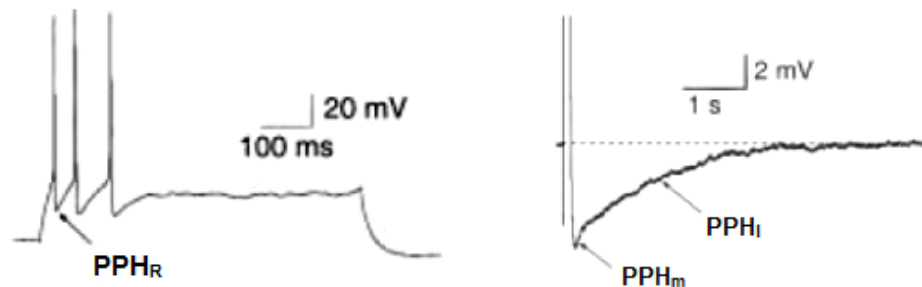


Figura 6. Se muestran los componentes del PPH. En A se muestra el PPH<sub>R</sub> y en B se muestran los componentes PPH<sub>L</sub> [Modificado de Faber y Sah, 2003].

## CANALES IÓNICOS

Todas las células que conforman a un ser vivo presentan en su membrana plasmática una serie de proteínas integrales de la membrana especializadas en la conducción de ciertas especies de iones, dichas proteínas son llamadas canales iónicos.

En células excitables, como lo son las neuronas, los canales iónicos son de gran importancia debido a que la apertura o cierre de estos genera cambios rápidos en el potencial de membrana de las neuronas, los cuales son necesarios para la transmisión de la información a través del sistema nervioso [Siegelbaum y Koester, 2000], permitiendo el movimiento iónico, principalmente de iones Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, entre el medio intracelular y extracelular (Hammond, 2008), existiendo canales iónicos selectivos para cada uno de estos iones.

Los canales iónicos poseen tres características intrínsecas que les permiten realizar los cambios en el potencial de membrana, estas características son: capacidad de conducir iones; reconocer y seleccionar iones específicos; se abren

y cierran en respuesta a estímulos eléctricos, químicos o mecánicos específicos [Siegelbaum y Koester, 2000]. De acuerdo a esta última característica los canales iónicos se pueden dividir en tres grandes grupos, los cuales son [Siegelbaum y Koester, 2000; Purves, 2004; Leuchtag, 2008]:

- canales dependientes de voltaje: su apertura y cierra depende de los cambios en el potencial de membrana; este tipo de canales está implicado en el mantenimiento del potencial de membrana y en la generación de los potenciales de acción.
- canales dependientes de ligando: son regulados (se abren o cierran) por la unión directa de un ligando, por ejemplo un neurotransmisor o por moléculas que se encuentran en el interior del citoplasma, en un sitio específico del canal, ya sea en la parte extra o intracelular. Los canales dependientes de la unión de un neurotransmisor son esenciales para la transmisión sináptica y para otros tipos de comunicación intercelular, mientras que la principal función de los canales dependientes de ligando que son activados desde el interior de la célula es transformar las señales químicas intracelulares en señales eléctricas.
- Canales de apertura mecánica: son activados por calor o por un deformamiento en la membrana plasmática, estos canales están relacionados con la detección del dolor y de cambios de temperatura.

Como se mencionó anteriormente los canales dependientes de voltaje están implicados directamente con el mantenimiento del potencial de membrana, principalmente por la acción de ciertas familias de canales de  $K^+$  y  $Cl^-$ , y en la generación del potencial de acción, en este fenómeno los canales iónicos que participan de manera directa son los canales de  $Na^+$  (fase de depolarización y los canales de  $K^+$  (fase de repolarización e hiperpolarización), sin embargo, se sabe que los canales de  $Ca^{2+}$  tienen un papel importante en la generación de los

patrones de disparo que presentan diferentes poblaciones neuronales, incluyendo a las neuronas espinosas medianas [Purves, 2004; Hammond, 2008].

## **Canales de Calcio**

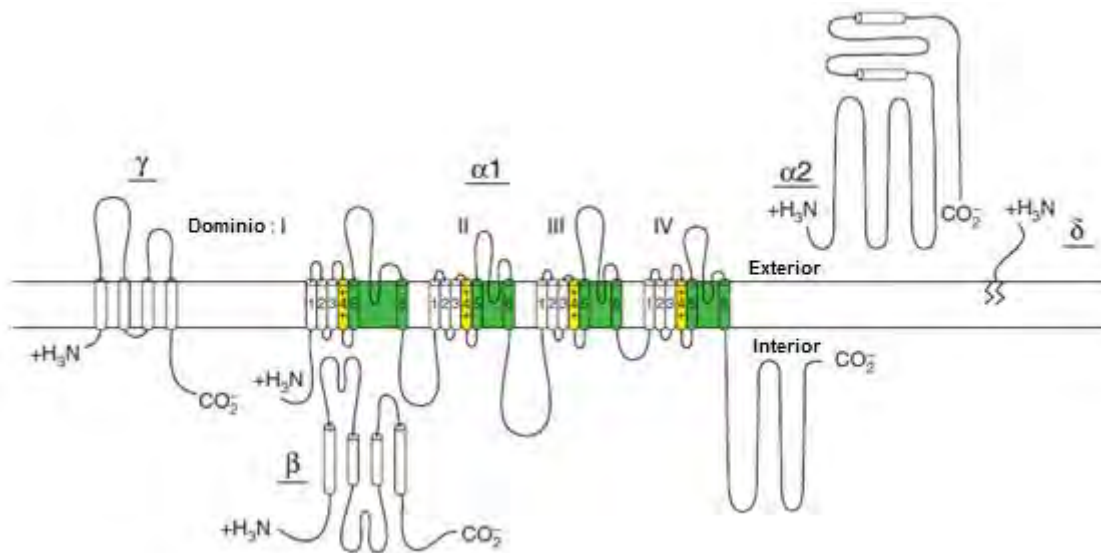
Los canales de calcio, los cuales pueden ser activados por voltaje, permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al interior de la célula influyendo en la actividad eléctrica y en otras respuestas celulares, [Tsien, 1988]. Esto es debido a que un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es un requerimiento, por ejemplo, para la liberación de neurotransmisores, la contracción de fibras de musculares o en la despolarización de la membrana de las dendritas de las células de Purkinje [Hammond, 2008; Purves *et. al*, 2007].

### Estructura general de los canales de calcio

De manera general los canales de calcio dependientes del voltaje de alto umbral tienen una estructura conformada por cuatro subunidades: la subunidad principal  $\alpha_1$ , la cual da las características biofísicas y farmacológicas a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , es decir, forma la estructura pseudotetramérica del canal, el sensor de voltaje, el poro del canal, el sitio de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  y los sitios de unión para las dihidropiridinas y fenilalquilamidas; los canales de calcio también presentan una subunidad intracelular fosforilada  $\beta$ , una subunidad transmembranal  $\gamma$  (esta subunidad no se encuentra presente en todos los tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ); y una subunidad  $\alpha_2\delta$  [Moreno, 1999; Suppiramaniam, *et al.* 2010; Catterall, 2011; figura 7].

La subunidad  $\alpha_1$ , está conformado por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6), de ellos el segmento S4 funciona como sensor de voltaje para la activación del canal; el asa entre los segmentos S5 y S6 forman el poro. La subunidad  $\beta$  es una subunidad auxiliar la cual tiene cuatro isoformas ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ), las cuales afectan la cinética del canal y dependencia del voltaje para la apertura del poro, esto significa que la asociación de la subunidad  $\alpha_1$  con diferentes subunidades  $\beta$  puede modificar de manera significativa la función de la subunidad  $\alpha_1$ . La subunidad  $\gamma$  la cual es una proteína

estructural de la membrana [Moreno, 1999; Catterall, 2000; Suppiramaniam, *et al.* 2010; Catterall, 2011; figura 7].



**Figura 7. Estructura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .** La estructura general de los canales de calcio se encuentra conformada por cuatro subunidades: una subunidad  $\alpha_1$  la cual a su vez se compone de cuatro dominios cada uno con seis segmentos transmembranales, el segmento cuatro funciona como el sensor de voltaje del canal y entre los segmentos 5 y 6 se forma el poro de selectividad; las otras tres subunidades que componen la estructura general de los canales de calcio son la subunidad  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha_2\delta$  [Tomado de Catterall, 2011].

### *Clasificación de los canales de calcio*

Los canales de calcio se han clasificado en cinco tipos diferentes los cuales son los canales L, N, P/Q, R y T, estos se encuentran distribuidos en tres subfamilias distintas de acuerdo a la similitud de secuencias que presentan las subunidades  $\alpha_1$ , cada una de ellos con distribuciones y funciones distintas:  $\text{Ca}_v1$  (canales L) inicia la contracción muscular, regula la expresión genética, integra las entradas sinápticas a la neuronas y participa en la transmisión sináptica de células sensoriales especializadas;  $\text{Ca}_v2$  (canales N, P/Q y R), esta subfamilia está involucrada principalmente en la iniciación de la transmisión sináptica y en la sinapsis rápida; y  $\text{Ca}_v3$  (canales T) acompañan a la despolarización de los canales de sodio durante la generación de potenciales de acción y en el disparo rítmico de las células como los miocitos y las neuronas talámicas (tabla1, figura 8) [Snutch, 2009; Catterall, 2011]

	Tipo de corriente	Localización	Bloqueador específico	Funciones
Ca <sub>v</sub> 1.1	L	Músculo esquelético	Dihidropiridinas	-Acoplamiento contracción-excitación en músculo esquelético - Homeostasis del Calcio - Regulación genética
Ca <sub>v</sub> 1.2		Músculo cardíaco Células endocrinas Neuronas		-Acoplamiento contracción-excitación en músculo esquelético - Regulación genética - Secreción hormonal
Ca <sub>v</sub> 1.3		Células endocrinas Neuronas		- Regulación genética - Secreción hormonal - Liberación tónica de neurotransmisor
Ca <sub>v</sub> 1.4		Retina		Transducción visual
Ca <sub>v</sub> 2.1	P/Q	Terminales nerviosas Dendritas	ω-Agatoxina	- Liberación de neurotransmisor -“Transitorios dendríticos de Ca <sup>2+</sup> ”
Ca <sub>v</sub> 2.2	N	Terminales nerviosas Dendritas	ω -CTx-GVIA	- Liberación de neurotransmisor -“Transitorios dendríticos de Ca <sup>2+</sup> ”
Ca <sub>v</sub> 2.3	R		SNX-482	- Potenciales de acción dependientes de Ca <sup>2+</sup> Liberación de neurotransmisor
Ca <sub>v</sub> 3.1	T	Músculo esquelético Músculo cardíaco Neuronas	Kurtoxina	-Marcapasos -Disparos repetitivos
Ca <sub>v</sub> 3.2		Músculo cardíaco Neuronas		
Ca <sub>v</sub> 3.3		Neuronas		

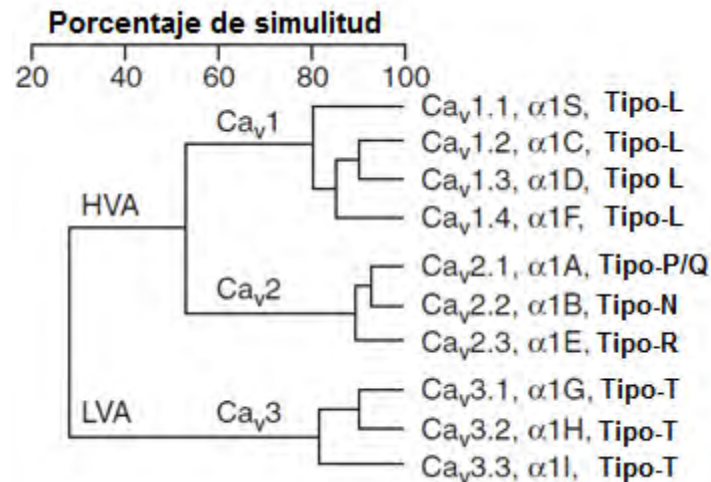
**Tabla 1.** Se muestran los distintos tipos de canales de Ca<sup>2+</sup>, así como su localización principal, bloqueadores, y funciones fisiológicas principales. ω-CTx-GVIA: conotoxina; SNX-482: toxina sintética del veneno de la tarántula *Hysteroecrates gigas* [modificado de Catterall, 2000 y 2011].

Estos cinco tipos de canales de calcio también se han clasificado en dos grupos, dependiendo del voltaje necesario para su activación, de este modo tenemos los canales que se activan a potenciales de membrana muy depolarizados (HVA), y los activados por voltajes cercanos al potencial de reposo de la membrana (LVA) [figura 8]

### Canales de calcio de alto umbral (HVA)

Los canales de calcio de alto umbral (HVA) engloban a los canales de tipo L ( $Ca_v1$ ), P/Q ( $Ca_v2.1$ ), N ( $Ca_v2.2$ ) y R ( $Ca_v2.3$ ); de manera general estos canales se activan con potenciales de membrana de entre los -40 a los -10 mV [Suppiramaniam, *et al.* 2010].

---



**Figura 8. Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje.** Los canales de calcio dependientes de voltaje se han dividido de acuerdo al voltaje necesario para su activación teniendo a los canales de alto umbral de activación (HVA), los cuales incluyen a los canales tipo L, P/Q, N y R, y los canales de bajo umbral de activación (LVA) los cuales únicamente están conformados por los canales tipo T [Modificado de Hammond, 2008].

---

Los canales HVA pueden inactivarse mediante dos mecanismos, el primero de ellos es una inactivación dependiente del voltaje y tiempo, la cual solo es observable cuando existen depolarizaciones prolongadas; y una inactivación dependiente de calcio, esta inactivación se produce por el incremento de la concentración intracelular de calcio que se da como consecuencia de la apertura de estos canales, de manera específica se da una unión entre el calcio intracelular y la calmodulina [Lacinová, 2005].

Este grupo de canales de calcio están involucrados de manera directa con la generación de potenciales de acción, del postpotencial hiperpolarizante y de la liberación del neurotransmisor [Pineda, *et al.* 1998; Hammond, 2008].

### Canales tipo L ( $Ca_v1$ )

Las principales características que presentan los canales tipo L son: el voltaje necesario para la activación de estos canales oscila de valores positivos del potencial de membrana hasta los -30 mV, mientras que el rango de inactivación va de los -60 a los -10 mV, presentan una conductancia unitaria entre los 20-25 pS [Hille, 2001; Hammond, 2008].

Los canales tipo L pueden ser bloqueados selectivamente por dihidropiridinas, fenilalquilamidas y benzodiazepinas, mientras que el BayK 8644 es un agonista para este tipo de canales [Lacinová, 2005].

### Canales tipo P/Q ( $Ca_v2.1$ )

En los canales de calcio tipo P/Q el voltaje necesario para la activación de estos canales oscila de valores positivos del potencial de membrana hasta los -20 mV, el voltaje de inactivación para estos canales se ubica alrededor de los -17 mV, presentan una conductancia unitaria de entre los 9-19 pS. Los canales P/Q se bloquean con concentraciones micromolares de las toxinas  $\omega$ -Agatoxina-IVA y IVB, y a la  $\omega$ -Conotoxina-MVIIC [Hille, 2001; Catterall *et. al.* 2005].

### Canales tipo N ( $Ca_v2.2$ )

Los canales tipo N se caracterizan principalmente por las siguientes características: su voltaje de activación se encuentra en valores positivos del potencial de membrana (alrededor de los 7 mV), el voltaje de inactivación se haya alrededor de los -60 mV, presentan una conductancia unitaria de entre los 13 pS. Los canales tipo N son bloqueados selectivamente por la  $\omega$ -Conotoxina-GVIA [Hille, 2001; Catterall *et. al.*, 2005; Hammond, 2008].

### Canales tipo R ( $Ca_v2.3$ )

Algunas de las características que definen a los canales de calcio tipo R son: el voltaje para su activación oscila entre -40 a -25 mV, la inactivación de estos canales se produce en voltajes alrededor de los -70 mV, presentan una conductancia unitaria de entre los 15-20 pS. Estos tipo de canales de calcio

pueden ser bloqueados mediante la toxina SNX-482 y con concentraciones de níquel entre 30–50  $\mu\text{M}$  [Tottene, *et. al.* 2000; Catterall, *et. al.* 2005].

#### *Canales de calcio de bajo umbral (LVA)*

Las canales de calcio tipo T ( $\text{Ca}_v3$ ) son los únicos canales que integran al grupo de los canales LVA, los cuales son llamados de canales de bajo umbral debido a que el voltaje de activación de estos canales es alrededor de los -70 mV, muy cercano al potencial de reposo de la membrana, mientras que su rango de inactivación se encuentra entre los -100 a -60 mV [Hille, 2001; Suppiramaniam, *et al.* 2010].

Las corrientes generadas por dichos canales son corrientes transitorias con una inactivación rápida ( $\tau = 20\text{-}50$  ms), presentan una deactivación relativamente lenta y una conductancia unitaria de alrededor de los 8 pS; este tipo de canales son insensibles a los antagonistas orgánicos conocidos para los canales de calcio, sin embargo, pueden ser bloqueados por el catión divalente  $\text{Ni}^{2+}$  [Yunker, *et. al.*, 2003].

#### CANALES DE CALCIO PRESENTES EN NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS

En las NEM los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sus funciones los patrones de disparo de las neuronas, también los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  participan en la frecuencia de disparo generando un postpotencial hiperpolarizante el cual tiene un papel importante en los disparos repetitivos que presentan las NEM [Galarraga *et al.* 1989]. En ese sentido, se sabe que el bloqueo de los canales de calcio por medio de la aplicación de cadmio en neuronas neocorticales de rata incrementa la frecuencia de disparo y bloquea de manera significativa los componentes rápidos y lentos del PPH [Pineda *et al.*, 1992]. Por otro lado la activación de los canales de potasio dependientes de calcio en las neuronas neocorticales de rata, es producida preferentemente por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de calcio HVA [Vilchis *et al.*, 2000], principalmente los canales N y P/Q, el bloqueo de estos canales con antagonistas específicos reduce de manera significativa el PPH observado en este tipo neuronal.



Se sabe que al bloquear canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L hubo un decremento en la frecuencia de disparos de las neuronas neoestriatales de rata, mientras que al bloquear los canales tipo N y P/Q se produjo un aumento en la frecuencia de los disparos [Pérez-Garci et al., 2003].

Sin embargo el conocimiento que se tiene sobre cómo es controlado el patrón de disparo en grupos diferentes a mamíferos, como es el caso de los reptiles, es poco por lo cual es importante investigar y entender si este control se da de manera similar a lo reportado para los mamíferos.

## **HIPÓTESIS**

Diversos estudios han mostrado que las características anatómicas, neuroquímicas y conexiones de los ganglios basales han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución de los vertebrados, y más específicamente, se ha observado que existe una gran similitud en las características morfológicas y electrofisiológicas que presentan las neuronas espinosas medianas del estriado de mamíferos y reptiles, por lo cual se espera que los canales iónicos, específicamente, canales de calcio dependientes de voltaje presentes en ambos grupos sean similares, pero que dichos canales presenten diferencias en la contribución en la generación del patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar cuál es el papel de los canales de calcio en la generación del patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas en el estriado de la tortuga *Trachemys scripta elegans*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Caracterizar electrofisiológicamente las neuronas espinosas medianas de tortuga.

- Determinar, mediante el bloqueo farmacológico de los canales de calcio, que familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran involucradas en la generación del patrón de disparo de las NEM.
- Identificar las similitudes y diferencias de las características electrofisiológicas de las NEM de tortuga y mamíferos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **ORGANISMOS**

Se utilizaron tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) de aproximadamente un año de edad (plastrón de 9-15 cm), sin importar el sexo, criadas en el Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala.

### **OBTENCIÓN DE REBANADAS**

Para la obtención de la rebanadas del cerebro de las tortugas, éstas fueron inicialmente anestesiadas con pentobarbital sódico (100 mg/kg) aplicado de manera intraperitoneal. En el momento en que el animal se anestesió completamente, aproximadamente 15 a 20 minutos después de la aplicación del pentobarbital sódico, se procedió a sacrificar a las tortugas mediante decapitación para de esta manera extraer el cerebro completo. Obtenido el cerebro de las tortugas, éste fue colocado en solución salina Krebs (en mM: 15,  $\text{NaHCO}_3$ ; 2,  $\text{MgCl}_2$ ; 5, KCl; 120, NaCl; 3,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 20, glucosa; 0.20, tiourea 0.18, L-ascorbato a pH 7.4), saturada con una mezcla de  $\text{CO}_2$  (95%) y  $\text{O}_2$  (5%) a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

Las rebanadas del cerebro se obtuvieron con la ayuda de un vibratomo (Ted Pella, Inc.) realizando cortes coronales de 250  $\mu\text{m}$  de grosor; todo el proceso del corte se realizó con el cerebro sumergido en solución Krebs a 4 °C y con una oxigenación constante. Una vez obtenidas las rebanadas coronales del cerebro de tortuga, éstas se colocaron en una caja Petri con solución Krebs a temperatura ambiente y se mantuvieron con oxigenación constante; para la realización del

registro electrofisiológico se esperó un tiempo de aproximadamente 1 h después de haberse finalizado la realización de los cortes histológicos.

## REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

El registro electrofisiológico se realizó en las NEM del estriado dorsolateral de la tortuga, utilizando técnicas convencionales de fijación de voltaje en microáreas de membrana (técnicas de patch-clamp) en su modalidad de célula entera (whole cell).

Se utilizaron microelectrodos de vidrio (con una resistencia de 3-6 M $\Omega$ ) los cuales fueron fabricados con un estirador de pipetas (P87, Sutter Instrument Co., Novato, USA) y llenados con solución interna (en mM: 120 KSO<sub>3</sub>CH<sub>4</sub>, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na; pH 7.3, 290 mOsM/L).

Para la realización de los registros electrofisiológicos las rebanadas del cerebro de tortuga fueron trasladadas a la cámara de registro la cual contaba con un flujo constante de solución Krebs oxigenada. Mediante el empleo de microscopia DIC (Differential-Interference Contrast) se visualizaron las neuronas, las cuales se eligieron con ciertas características morfológicas para ser aptas para el registro; la principal característica que debían presentar las neuronas era que el soma no debía observarse hinchado o plasmolisado.

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con un amplificador (Amplificador BVC-700A, DAGAN, Minneapolis, USA) en la modalidad de fijación de corriente (current-clamp); todas las neuronas se mantuvieron en un potencial de membrana de  $\sim$ -80 mV. Por medio del electrodo de vidrio y del amplificador se enviaron pulsos cuadrados de corriente para evocar respuestas de voltaje en las neuronas registradas. Con la ayuda de un osciloscopio (Tektronix TDS 2012B) se observó la actividad de las neuronas a lo largo de todo el experimento.

## PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Como primer paso, y con el objeto de identificar por sus propiedades electrofisiológicas a cada una de las neuronas registradas, se realizaron curvas intensidad-voltaje (curvas I/V). Para ello se enviaron pulsos cuadrados de corriente depolarizantes e hiperpolarizantes de 800ms de duración y con potenciales de mantenimiento de -80 mV. Además se realizaron curvas intensidad-frecuencia (curvas I/F), para lo cual se enviaron pulsos cuadrados de corriente despolarizante supraumbral (800 ms duración) para registrar disparos de potenciales de acción en voltaje de las neuronas, también a potenciales de mantenimiento de -80 mV.

Si las neuronas registradas cumplían con las propiedades electrofisiológicas características de las NEM, las curvas I/V e I/F realizadas inicialmente se tomaron como las curvas control para cada experimento, es decir, para los experimentos realizados en el presente trabajo la misma neurona fungió como su propio control.

Para la ejecución de las diferentes series experimentales se utilizaron distintos fármacos que bloquean diversos canales iónicos, previamente disueltos en solución salina se agregaron al sistema de perfusión, después de cinco minutos de haber adicionado los fármacos se procedió a realizar el protocolo de curvas I/F antes y después de la aplicación de los fármacos, y a diferentes intervalos de tiempo con el propósito de monitorear los cambios en el patrón de disparo de las NEM por el bloqueo de diferentes canales iónicos.

## FÁRMACOS

Los fármacos utilizados para la realización de las diferentes series experimentales fueron los siguientes:

- Cadmio, bloqueador inespecífico de los canales de calcio (50  $\mu$ M, Sigma-Aldrich)
- Níquel, bloqueador de canales de calcio (10 y 100  $\mu$ M, Sigma-Aldrich)

- $\omega$ -conotoxina-GVIA, bloqueador de canales de calcio tipo N (1  $\mu$ M, Alomone).
- $\omega$ -agatoxina-TK, bloqueador para canales de calcio de tipo P/Q (400 nM, Alomone).
- BayK-8644, agonista de canales de calcio tipo L (5  $\mu$ M, Alomone).
- Nifedipina, bloqueador para canales de calcio tipo L (10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich).

## ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos de las curvas I/V e I/F fueron digitalizados y analizados por medio de los programas comerciales Origin Pro 8 y SigmaPlot 10. Las curvas I-V fueron ajustadas utilizando un polinomio de segundo grado, que nos permitió calcular la resistencia de entrada de la célula registrada, mientras que para las curvas I-F se hizo un el ajuste sigmoideo. La frecuencia inicial de los potenciales de acción se calculó a partir del promedio de la frecuencia de las dos primeras espigas y la frecuencia final del promedio de las cuatro últimas. Para realizar la comparación del cambio en la frecuencia de disparo entre los grupos control y experimental de cada serie experimental se llevó a cabo la medición de la intensidad de corriente requerida para alcanzar una misma frecuencia de disparo en ambas condiciones, los datos de corriente obtenidos se utilizaron para la realización de las pruebas estadísticas.

Asimismo para reportar su diferencia significativa con respecto al control, a la curva I-F se le aplicó la prueba estadística “*t*” de Student para datos apareados. Para los parámetros electrofisiológicos y morfológicos se reportaron medias y errores estándar.

## RESULTADOS

### Caracterización electrofisiológica de las NEM el estriado de rata y de tortuga

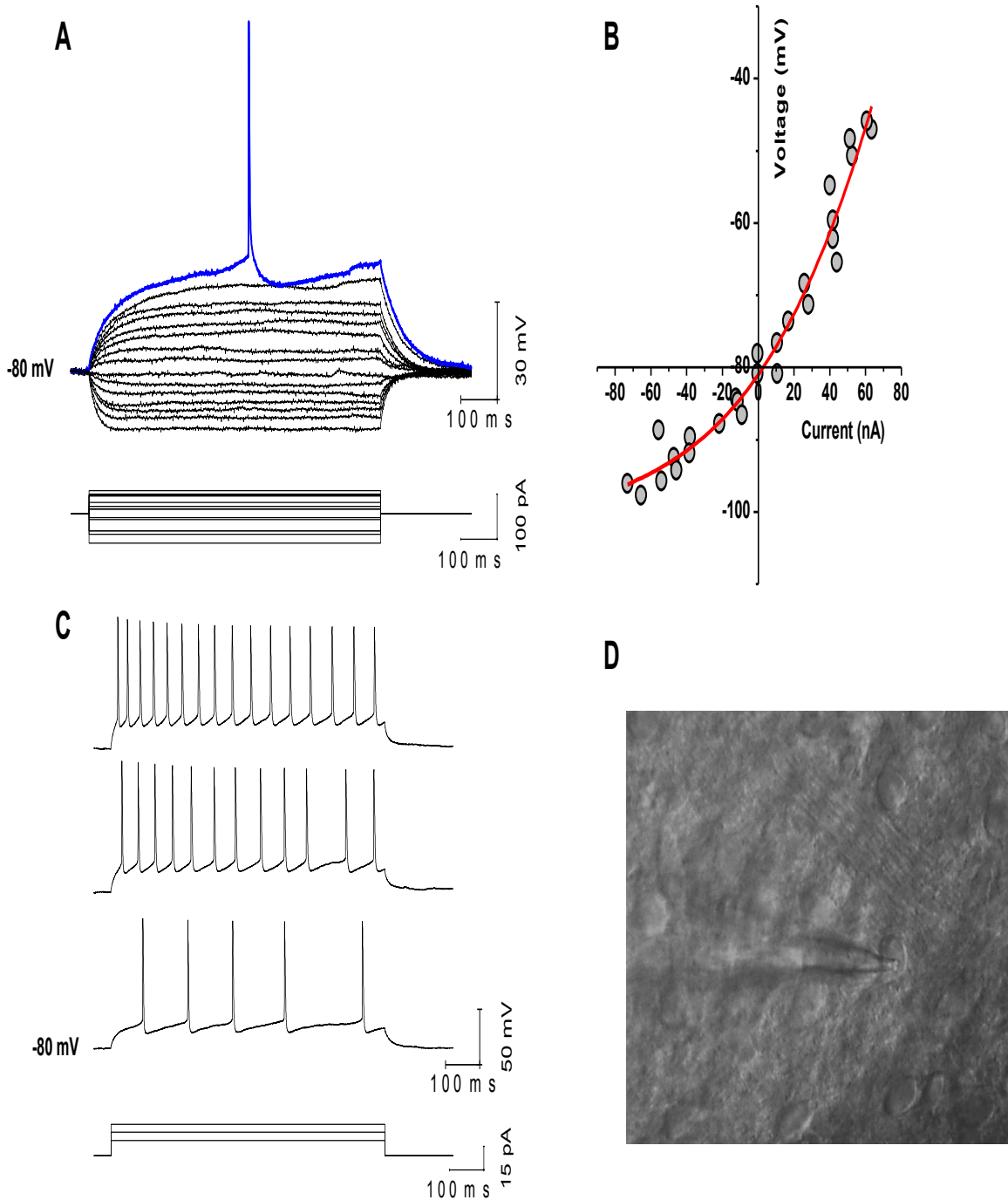
La caracterización electrofisiológica de las NEM del estriado de tortuga mostró que estas presentan las propiedades fisiológicas distintivas para esta estirpe neuronal, las cuales han sido reportadas en mamíferos. [Nisenbaum *et al.*,

1995; Barral *et al.*, 2010]. Cuando se realizaron las curvas I-V de las NEM, es posible observar rectificación, es decir que la amplitud de las respuestas de voltaje subumbrales a pulsos cuadrados de corriente de depolarizantes e hiperpolarizantes de la misma intensidad no son proporcionales. En mamíferos se ha reportado que esto se debe a la activación de conductancias de potasio ( $I_K$ ) [Galarraga et al, 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995], impidiendo que el potencial de la membrana se haga más negativo conforme aumentan los pulsos de corriente hiperpolarizante tal como se aprecia en el registro de las NEM de rata [figura 9] y de tortuga [figura. 10].

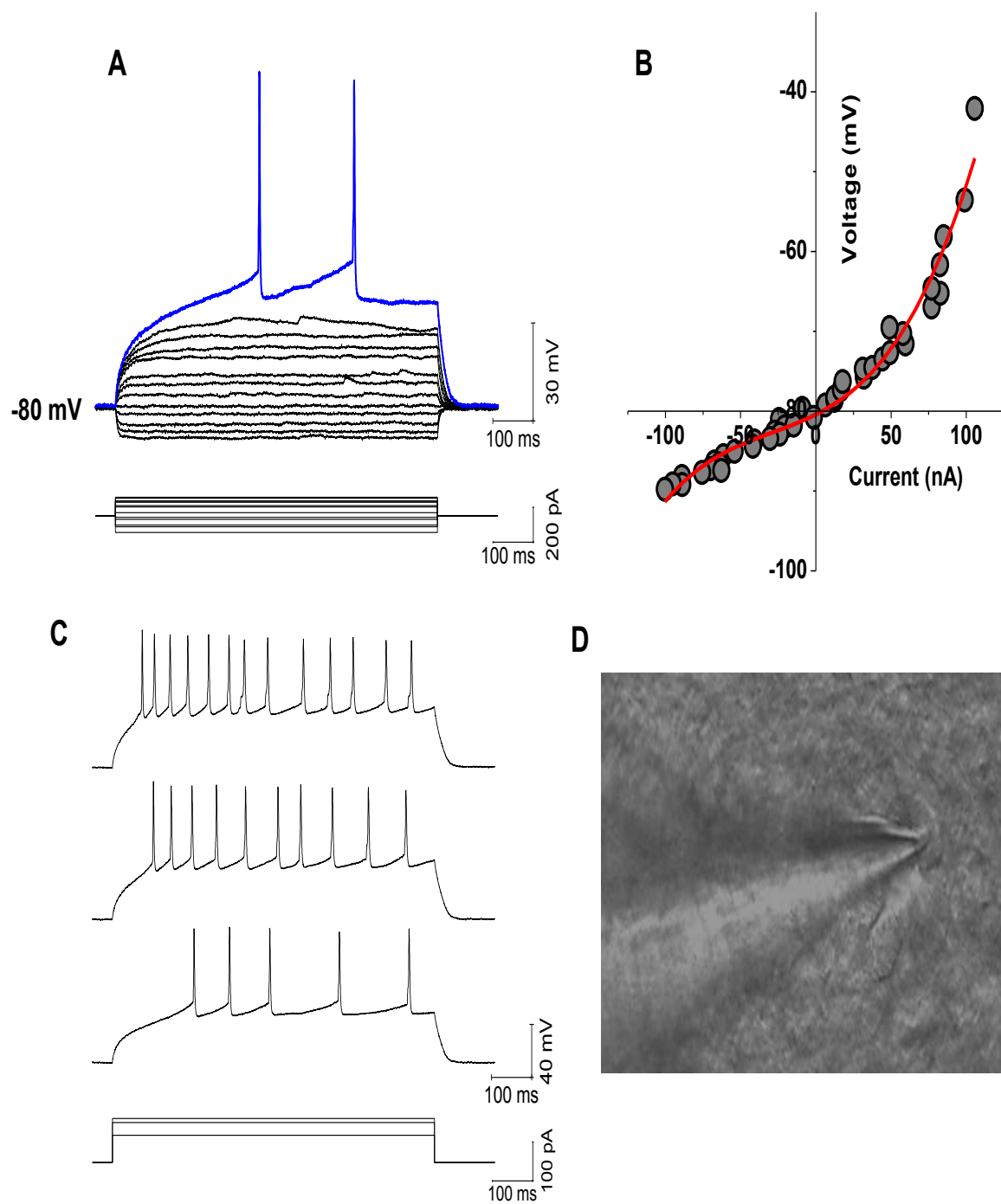
Por otro lado, cuando se inyectan pulsos de corriente depolarizantes hasta la aparición de un primer potencial de acción único, todas las NEM, tanto de tortuga como de rata respondieron con un incremento gradual tipo rampa en el potencial de la membrana con un marcado retraso en la aparición del potencial de acción [figura 9 y 10]. Tanto en mamíferos como en aves se ha reportado que esta característica se debe a la activación de corrientes de potasio tipo A sensibles a 4-aminopiridina [Bargas et al, 1989; Farries and Perkel, 2000]. Es la presencia de esta corriente  $I_A$  la que genera el retraso en la generación del primer potencial de acción.

Por último, cuando se inyectan pulsos cuadrados de corriente supraumbral, aparece un número variable de potenciales de acción, dependiendo de la intensidad de la corriente inyectada. Sin embargo, es común observar que al inicio del trazo de voltaje aparecen potenciales de acción a una frecuencia mayor que la que se observa al final del mismo trazo, siendo independiente de la intensidad de estimulación utilizada. En la figura 9C para los registros de mamífero y en la figura 10C para los registros de tortuga se muestran registros representativos de las respuestas en voltaje a tres intensidades de corriente; los trazos presentados exhiben el fenómeno adaptación en la frecuencia de disparo, es decir, se puede observar que al inicio del estímulo el tiempo entre potenciales de acción es menor en relación a la separación que se observa hacia el final de la estimulación, esto se debe a que con cada potencial de acción entra calcio por la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, activando canales de potasio dependientes de

voltaje, responsables de generar el PPH el cual regula esta adaptación en la frecuencia de disparo.



**Figura 9. Características electrofisiológicas de las NEM de rata.** A: registro electrofisiológico de una neurona espinosa de mediana de rata en el cual se puede observar el retraso en la aparición del primer potencial de acción (a), el postpotencial hiperpolarizante (b). B: relación de corriente-voltaje (curva I/V) en la cual se puede observar la rectificación entrante característica de las NEM. C: proceso de adaptación a tres intensidades de corriente distintas. D: fotografía del electrodo de registro haciendo contacto con la neurona espinosa mediana de rata.



**Figura 10. Características electrofisiológicas de las NEM de tortuga.** A: registro electrofisiológico de una neurona espinosa de mediana de tortuga en el cual se puede observar el retraso en la aparición del primer potencial de acción (a), el postpotencial hiperpolarizante (b). B: relación de corriente-voltaje (curva I/V) en la cual se puede observar la rectificación entrante característica de las NEM. C: proceso de adaptación a tres intensidades de corriente distintas. D: fotografía del electrodo de registro en el momento de entrar en contacto con la neurona espinosa mediana de tortuga a 40x.



## **Bloqueo inespecífico de canales de $\text{Ca}^{2+}$ mediante la aplicación de $\text{Cd}^{2+}$**

Desde hace tiempo se han realizado observaciones acerca de que el bloqueo de conductancias de calcio, por ejemplo con cadmio, produce un paradójico en la frecuencia de disparo de las NEM. Es decir, que al reducir una importante corriente entrante, en lugar de disminuir la frecuencia de disparo, ésta aumenta. En el caso de las NEM de mamífero, esta respuesta involucra conductancias de potasio dependientes de calcio que producen el postpotencial hiperpolarizante (PPH).

Para corroborar la presencia de canales de calcio en las NEM de tortuga se utilizó al cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), el cual actúa como bloqueador inespecífico de canales de calcio; la figura 11 muestra el efecto producido en el patrón de disparo por la aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ).

Se puede observar que el bloqueo de canales de calcio por el cadmio produjo un incremento significativo en la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas ( $n=6$ ) posterior a su aplicación; en la figura 11A se presentan las respuestas en voltaje a tres estímulos de corrientes de diferentes intensidades, los trazos en negro representan la condición control y los trazos en azul la condición experimental ( $\text{Cd}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ ); bajo dicha condición experimental se observa que la frecuencia de disparo aumentó, debido a que posterior a la aplicación del  $\text{Cd}^{2+}$  se necesitó aplicar una menor intensidad de corriente para evocar la misma frecuencia de disparo obtenida en la condición control [figura 11B]. En la figura 11A es posible observar que aunado al aumento en la frecuencia de disparo se produjo una disminución en la amplitud del PPH.

Estos resultados muestran que en las NEM de la tortuga, al igual que en las de los mamíferos, existen canales de calcio dependientes de voltaje que se encuentran implicados en la generación del patrón de disparo característico de estas neuronas; sin embargo, el bloqueo con  $\text{Cd}^{2+}$  no indica cual o cuales canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están involucrados en cada una de los diferentes propiedades electrofisiológicas que han sido descritas anteriormente para las NEM de tortuga. Para discriminar la contribución de cada una de los tipos de canales de calcio al

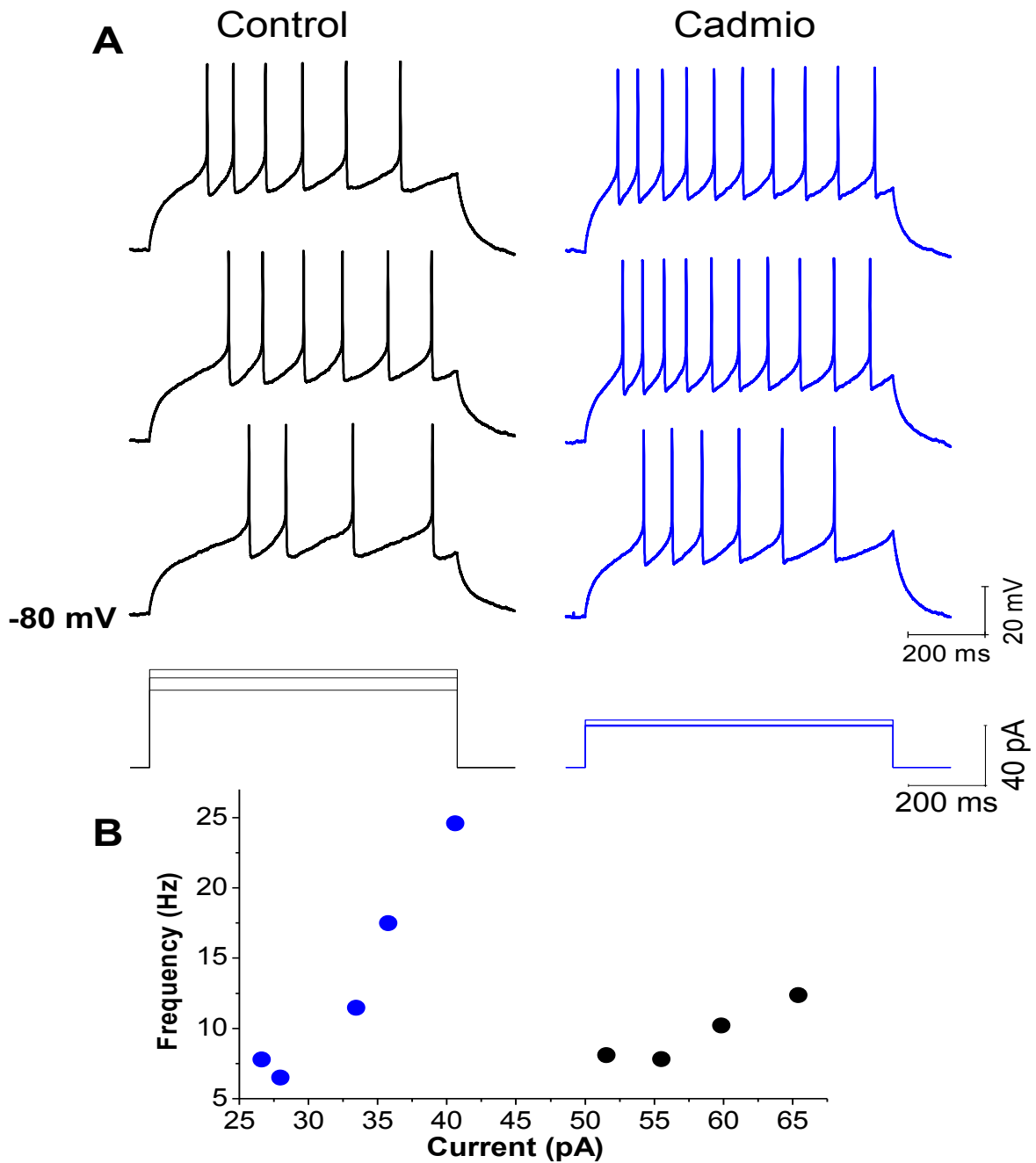
patrón de disparo se realizó el bloqueo con fármacos específicos para los diferentes canales de calcio dependientes de voltaje.

### **Bloqueo de canales de Ca<sup>2+</sup> mediante la aplicación de Ni<sup>2+</sup>**

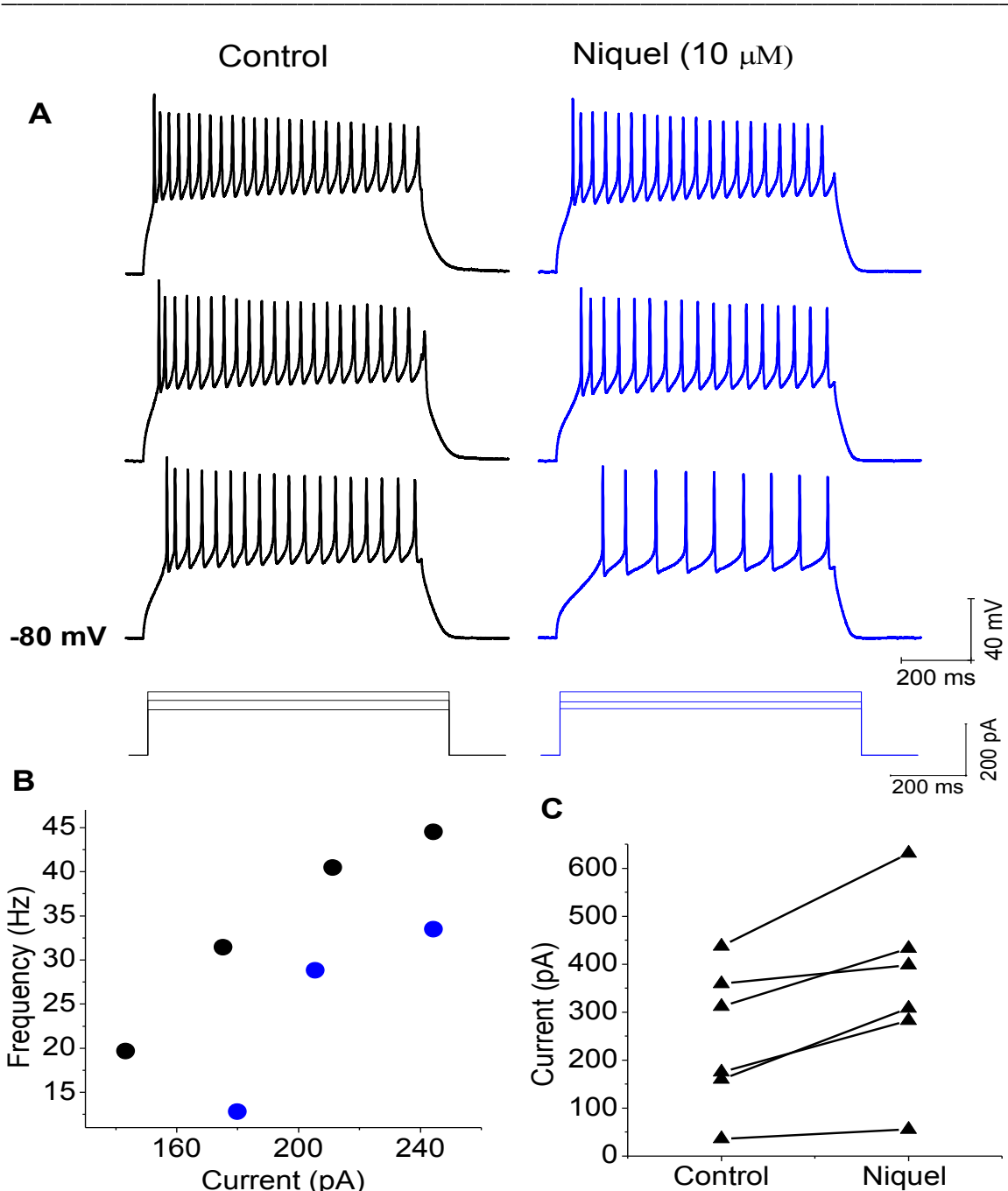
Los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T se activan a potenciales negativos y su inactivación es muy rápida. Muestran sensibilidad a toxinas como la Kurtoxina, y además se ha reportado que son altamente sensibles al níquel (Ni<sup>2+</sup>) [Dolphin *et al.*, 1990; Tsien *et al.*, 1991; Randall y Tsien, 1997; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Monteil *et al.*, 2000].

Para determinar si en esta estirpe neuronal existe la presencia de canales de calcio tipo T se utilizó níquel a las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  [figuras 11 y 12]. En ambas condiciones experimentales la frecuencia de disparo disminuyó de manera significativa, en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de níquel la intensidad de corriente necesaria para alcanzar la misma frecuencia de disparo incremento de  $246.72 \pm 60.58$  pA en la condición control a  $351.28 \pm 77.72$  pA en la condición experimental (n=6, P=0.006); dicha relación entre la intensidad de corriente y la frecuencia de disparo se muestra en la figura 11B, para el caso de la concentración de 100  $\mu\text{M}$  el incremento en la intensidad de corriente fue de  $285.91 \pm 74.30$  en la condición control a  $444.98 \pm 96.72$  en presencia de níquel 100  $\mu\text{M}$  (n=6, P= 0.036) [figura 12B].

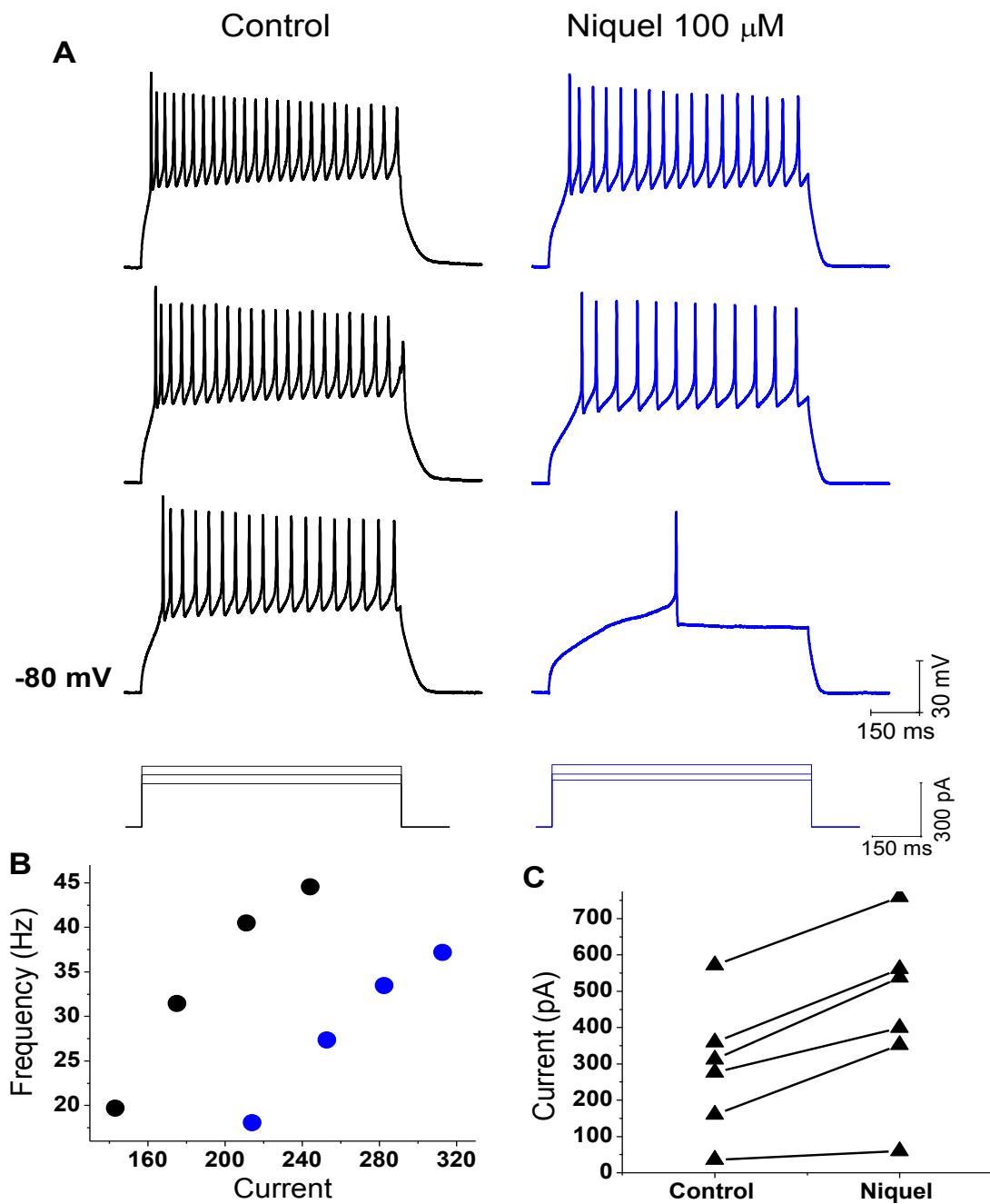
En las figuras 11A y 12B se muestran las respuestas de voltaje a tres intensidades de corrientes diferentes en la condición control (trazos en negro) en comparación con la condición experimental, 10 y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente (trazos en azul). Se puede notar que con la concentración de 100  $\mu\text{M}$  el decremento en la frecuencia de disparo fue mayor que en la condición de 10  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, es posible observar que en ambas condiciones experimentales no hubo cambios en el PPH no obstante que en ambos casos se dio una disminución en la meseta de disparo.



**Figura 11. Efecto de la aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) en las NEM de tortuga.** La administración de un catión divalente, como es el caso de  $\text{Cd}^{2+}$ , produjo un aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas del estriado de tortuga, en A se presentan el cambio en el patrón de disparo producido por el  $\text{Cd}^{2+}$ , observable como un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas. B: la relación I/F muestra que los puntos experimentales con cadmio (en azul) se desplazaron hacia la izquierda en relación con los puntos control (en negro), indicando una disminución en la intensidad de corriente necesaria para generar una respuesta en voltaje de las NEM.



**Figura 12. Efecto de la administración de níquel (10  $\mu$ M) en NEM de tortuga.** La aplicación de 10  $\mu$ M de níquel tuvo como efecto una disminución en la frecuencia de disparo, dicho cambio en la frecuencia se puede observar en el panel A donde se presenta la respuesta en voltaje a tres intensidades de corriente en la condición control (trazos en negro) y en presencia de 10  $\mu$ M de níquel (trazos en azul). En B se muestra la relación I/F, se puede notar que hubo un desplazamiento hacia la derecha de los puntos experimentales, en azul, indicando que en la condición experimental se requirió una mayor intensidad de la corriente aplicada para alcanzar la misma frecuencia de disparo que en el control. En C se presenta el cambio en la intensidad de corriente de todos los experimentos.



**Figura 13. Aplicación de níquel (100  $\mu\text{M}$ ) en NEM de tortuga.** La aplicación de 100  $\mu\text{M}$  de níquel tuvo como efecto una disminución en la frecuencia de disparo, dicho cambio en la frecuencia se puede observar en el panel A donde se presenta la respuesta en voltaje a tres intensidades de corriente en la condición control (trazos en negro) y en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de níquel (trazos en azul). En B se muestra la relación I/F, se puede notar que hubo desplazamiento hacia la derecha de los puntos experimentales, en azul, indicando que en la condición experimental se requirió una mayor intensidad de corriente para alcanzar la misma frecuencia de disparo que en el control. En C se presenta el cambio en la intensidad de corriente de todos los experimentos.

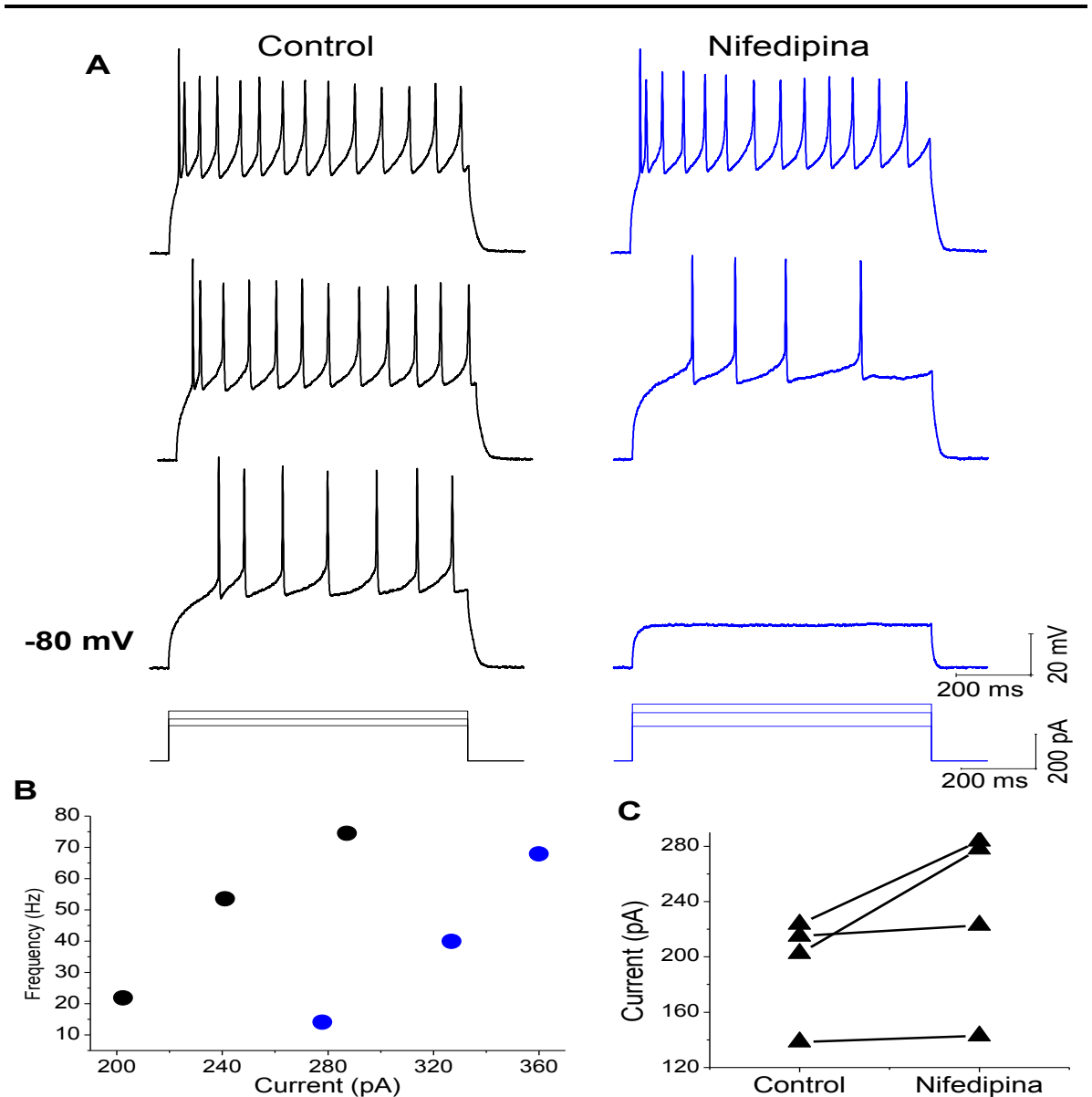
## **Contribución de canales tipo L (Cav1) al patrón de disparo de las NEM**

Para determinar la función de los canales de calcio tipo L en la generación del patrón de disparo se realizaron los experimentos en presencia de dos distintos fármacos, el primero de ellos la nifedipina que a 10  $\mu\text{M}$  actúa como bloqueador de este tipo de canales de calcio [figura 14]. El segundo fármaco utilizado fue el BayK-8644, que es un agonista de los canales tipo L, el cual se utilizó a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  [figura 15].

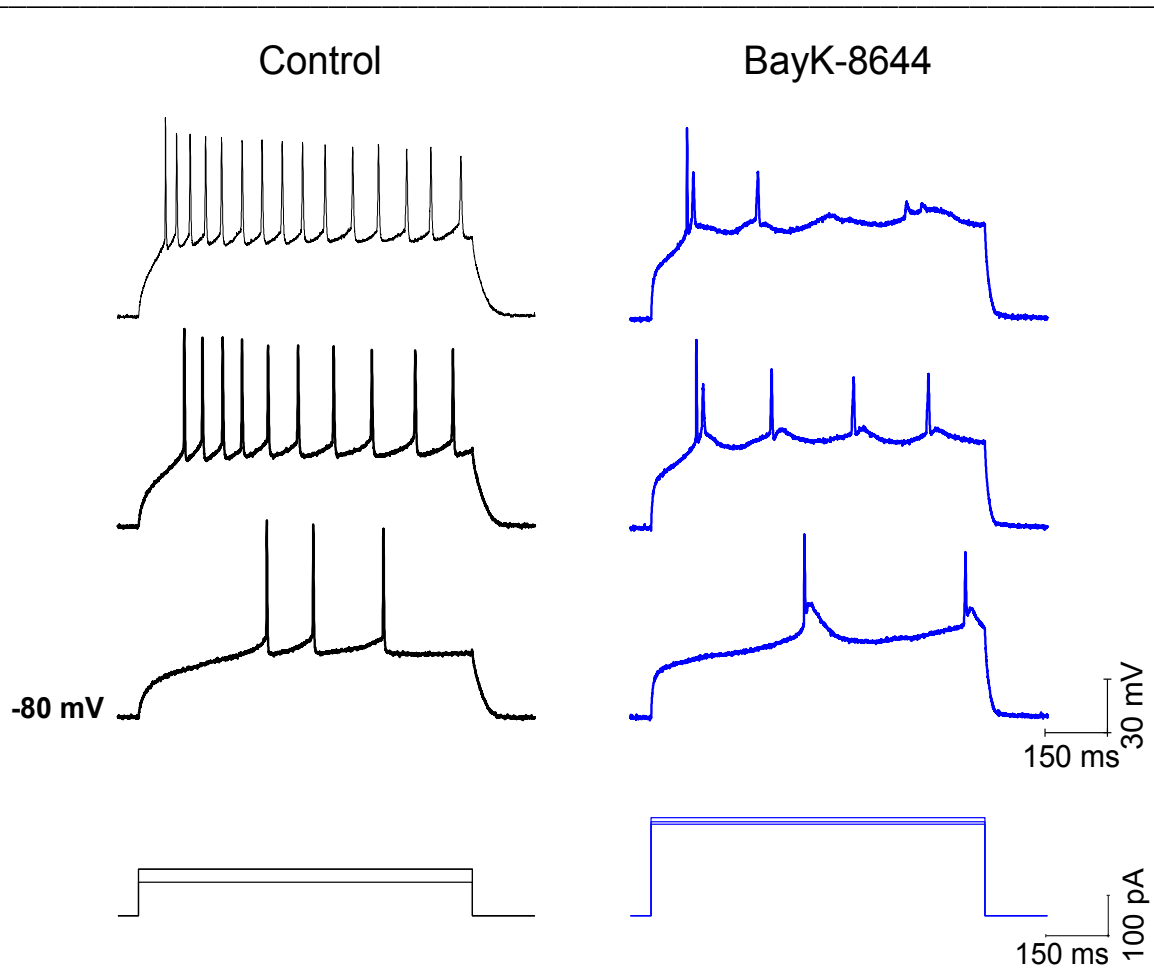
El bloqueo de canales tipo L mediante la aplicación de nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ) tuvo como consecuencia una disminución en la frecuencia, ya que se requirió una mayor intensidad de corriente en presencia de nifedipina ( $231.85 \pm 32.69$  pA,) para obtener la misma frecuencia en la respuesta de voltaje ( $194.92 \pm 19.27$  pA) este incremento en la intensidad de corriente fue estadísticamente significativo ( $n=4$ ,  $P<0.001$ ); en la figura 14A se pueden observar las respuestas de voltaje evocadas por tres estímulos de corriente de diferentes intensidades, los trazos en color negro corresponden a los registros control y los trazos en azul a los registros experimentales (nifedipina 10  $\mu\text{M}$ ); puede notarse que a intensidades de corriente similares, en la condición experimental se genera una menor cantidad de potenciales de acción e incluso puede observarse que en intensidad más baja no se evocaron potenciales de acción en comparación con la condición control; la disminución en la frecuencia de disparo puede ser atribuida a la disminución en la meseta de disparo, la cual también se puede observar en la figura 14A.

Por otro lado, a pesar de que existen diversos bloqueadores para los diferentes canales de calcio, sólo se conoce un agonista para ellos y actúa sobre los canales tipo L, por ello se aplicó BayK-8644 (5  $\mu\text{M}$ ). Aunque no tuvo efectos significativos sobre la frecuencia de disparo, se produjo un cambio drástico en el patrón de disparo de las NEM, suponemos que fue provocado por la gran entrada de calcio. En la figura 15 se puede apreciar que posterior a la aplicación del agonista para los canales de calcio tipo L, el patrón de disparo repetitivo cambio a un patrón de disparo en mesetas; estas. Las mesetas observadas son producidas

por el aumento en la entrada de calcio como consecuencia del aumento en la apertura de este tipo de canales de calcio.



**Figura 14. Cambio en la frecuencia de disparo de las NEM generado tras la aplicación de nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ).** El bloqueo farmacológico de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L mediante la aplicación de nifedipina generó un decremento en la frecuencia de disparo, lo cual puede observarse en A los trazos de voltaje (control en negro y nifedipina en rojo) obtenidos por la estimulación de tres intensidades de corriente diferentes, en los cuales puede notarse la clara disminución de la frecuencia de disparo del registro control contra el registro experimental. En B se presenta la curva I/F realizada a partir de los registros presentados en A; puede observarse que los puntos experimentales (en rojo) se desplazaron hacia la derecha, indicando que tras la aplicación de la nifedipina se requirió una mayor intensidad de corriente para evocar la misma o una menor respuesta en voltaje.



**Figura 15. Cambio en el patrón de disparo provocado por la aplicación de BayK-8644.** La aplicación del agonista para canales de calcio tipo L tuvo como efecto el cambio de un patrón de disparo repetitivo a un patrón de disparo en mesetas, las cuales son consecuencia de una mayor entrada de calcio a través de este clase de  $\text{Ca}^{2+}$ .

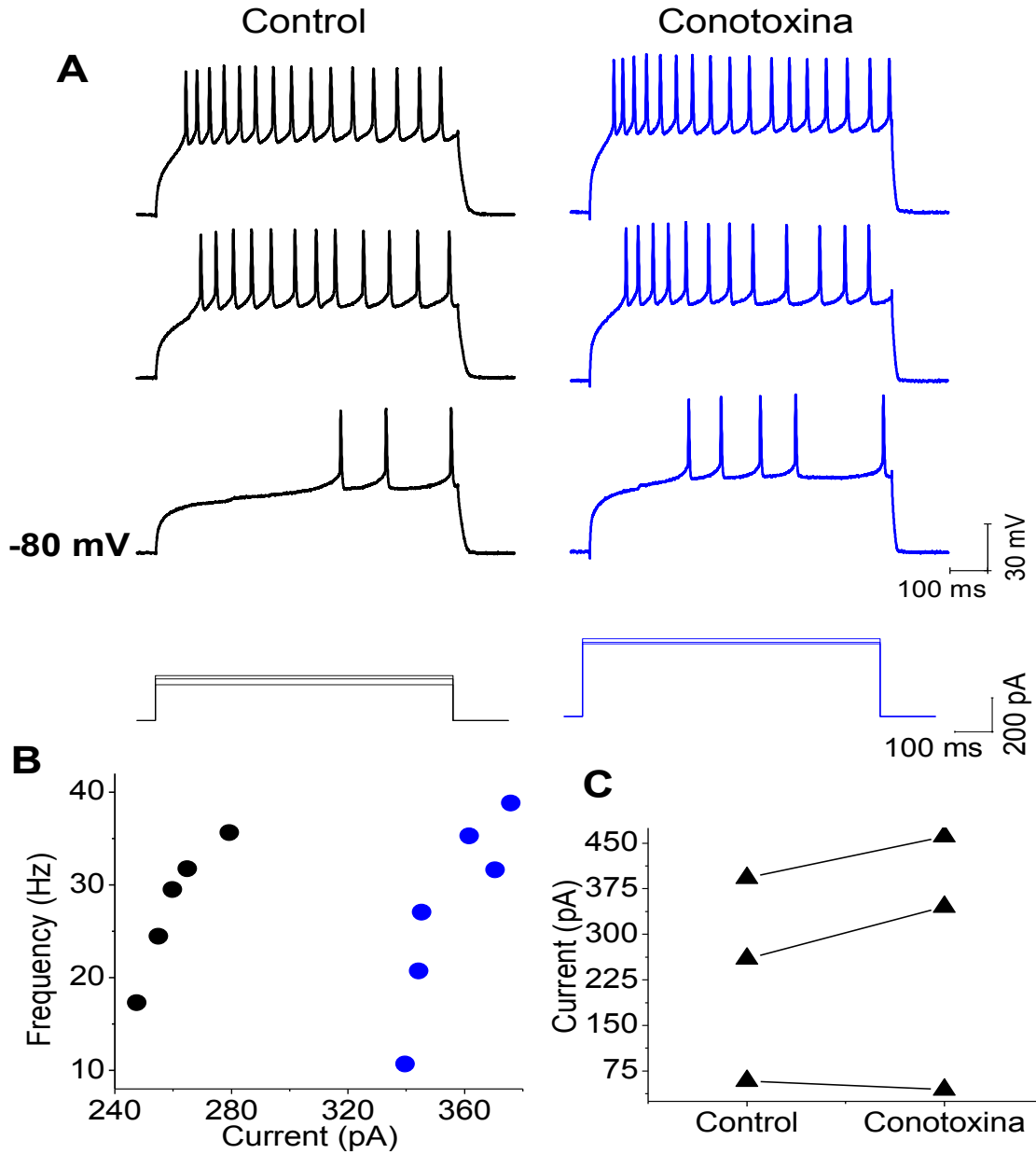
### **Papel de los canales tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) en el patrón de disparo de las NEM**

Con el fin de determinar el papel que juegan los canales tipo N en la generación del patrón de disparo se utilizó la  $\omega$ -conotoxina-GVIA (1  $\mu\text{M}$ ) para bloquear de manera específica este tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El bloqueo farmacológico tuvo como consecuencia un incremento en la intensidad de corriente necesaria para alcanzar la misma frecuencia de disparo, siendo que en la condición control se requirió de  $237.075 \pm 96.99$  pA mientras que tras la aplicación  $\omega$ -conotoxina-GVIA la corriente necesaria aumento  $283.63 \pm 124.26$  pA, lo cual indica que en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA hubo una disminución en la

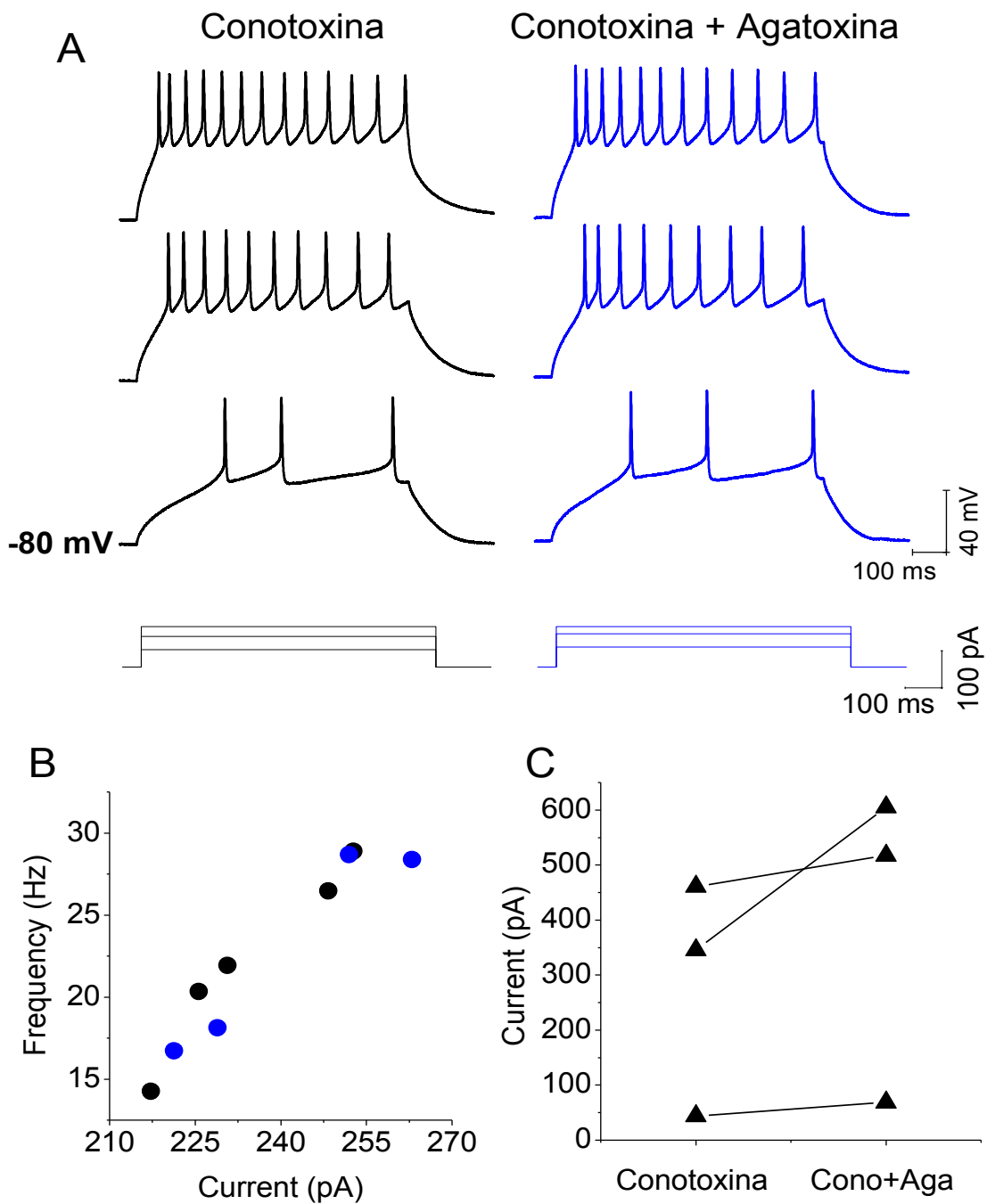


frecuencia de disparo la cual fue estadísticamente significativa ( $n= 6$ ,  $P=<0.001$ ), la relación intensidad de corriente/frecuencia de disparo se puede observar en la figura 16B. En la figura 16A se muestran la respuesta en voltaje a tres intensidades de corriente en el control (trazos negros) y en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA (trazos azules), en la cual es posible observar el incremento en la intensidad de corriente para evocar una respuesta similar en la frecuencia de disparo en ambas condiciones, asimismo puede notarse que la aplicación de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA no afectó la amplitud del PPH de las neuronas espinosas medianas de tortuga.

Para determinar si existe una interacción entre los canales tipo N y P/Q en las NEM de tortuga se realizó el bloqueo farmacológico de los canales P/Q mediante la aplicación de la  $\omega$ -agatoxina-TK, esta toxina se aplicó de 15 a 20 minutos después de haber agregado el bloqueador para los canales tipo N, esto con el fin de establecer si la  $\omega$ -agatoxina-TK (400 nM) potencia el efecto producido por la  $\omega$ -conotoxina-GVIA observado en la figura 16. Los resultados de esta serie experimental mostraron que la  $\omega$ -agatoxina-TK no produjo cambios significativos ( $n=6$ ,  $P=0.147$ ) en la intensidad de corriente necesaria para evocar la misma frecuencia de disparo en la condición en la cual se encontraban bloqueados únicamente los canales tipo N ( $283.63 \pm 124.26$  pA) respecto a la condición en la cual tanto los canales N y P/Q fueron bloqueados ( $397.12 \pm 166.28$  pA); en cuanto al PPH no se observaron cambios en la amplitud de este en ninguna condición experimental [figura 17A y 17B].



**Figura 16. Papel de los canales tipo N ( $Ca_v2.2$ ) en el patrón de disparo de las NEM de tortuga.** El bloqueo farmacológico de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N mediante la aplicación de  $\omega$ -conotoxina-GVIA tuvo como resultado un aumento en la intensidad de corriente necesaria para obtener la misma frecuencia de disparo; en A se muestra la respuesta en voltaje en la condición control (negro) y en presencia de  $\omega$ -conotoxina-GVIA (azul) a tres intensidades de corriente similares puede apreciar que en la condición experimental se produjo un decremento en la frecuencia de disparo así como una disminución en la amplitud del PPH. En B se muestra la relación I/F en la cual se puede observar un desplazamiento hacia la derecha de los puntos experimentales (en azul) indicando que en la condición experimental se requirió una mayor intensidad de frecuencia para alcanzar la misma frecuencia de disparo que en el control. En C se presenta el cambio en la intensidad de corriente de todos los experimentos.



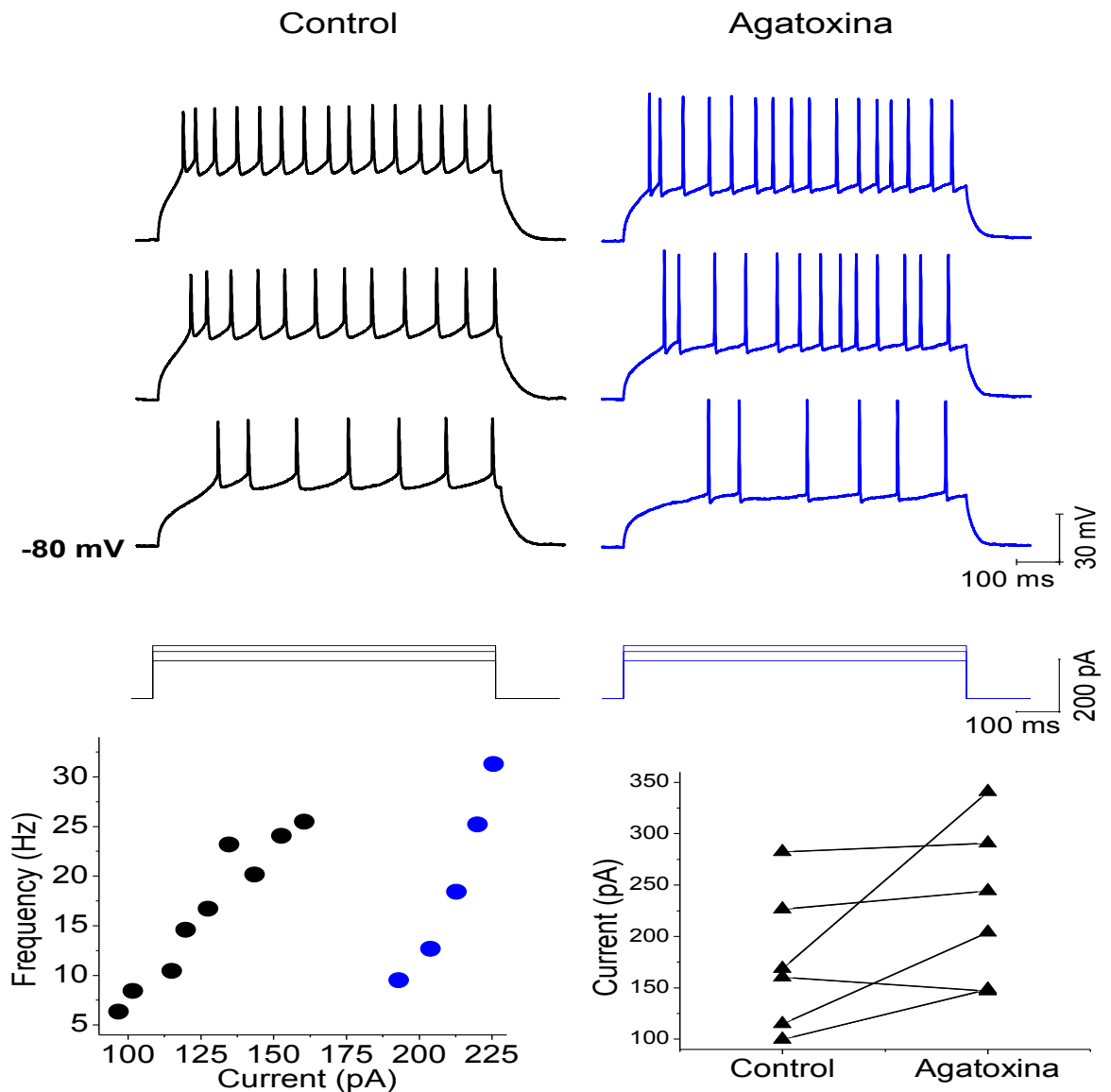
**Figura 17. Papel de los canales tipo N ( $Ca_v2.2$ ) y P/Q ( $Ca_v2.1$ ) en el patrón de disparo de las NEM de tortuga.** EL bloqueo conjunto de los canales N y P/Q mediante  $\omega$ -Conotoxina-GVIA y  $\omega$ -Agatoxina-TK, respectivamente, no provocó ningún cambio significativo en la frecuencia de disparo ni en la amplitud de las NEM, lo cual se puede observar en el panel A. En B se muestra la relación I/F en la cual se puede observar que no hubo un incremento en la intensidad de corriente necesaria para evocar una misma respuesta en la frecuencia de disparo en ambas condiciones experimentales. En C se presenta el cambio en la intensidad de corriente de todos los experimentos.

## **Participación de los canales tipo P/Q ( $Ca_v2.1$ ) en el patrón de disparo de las NEM**

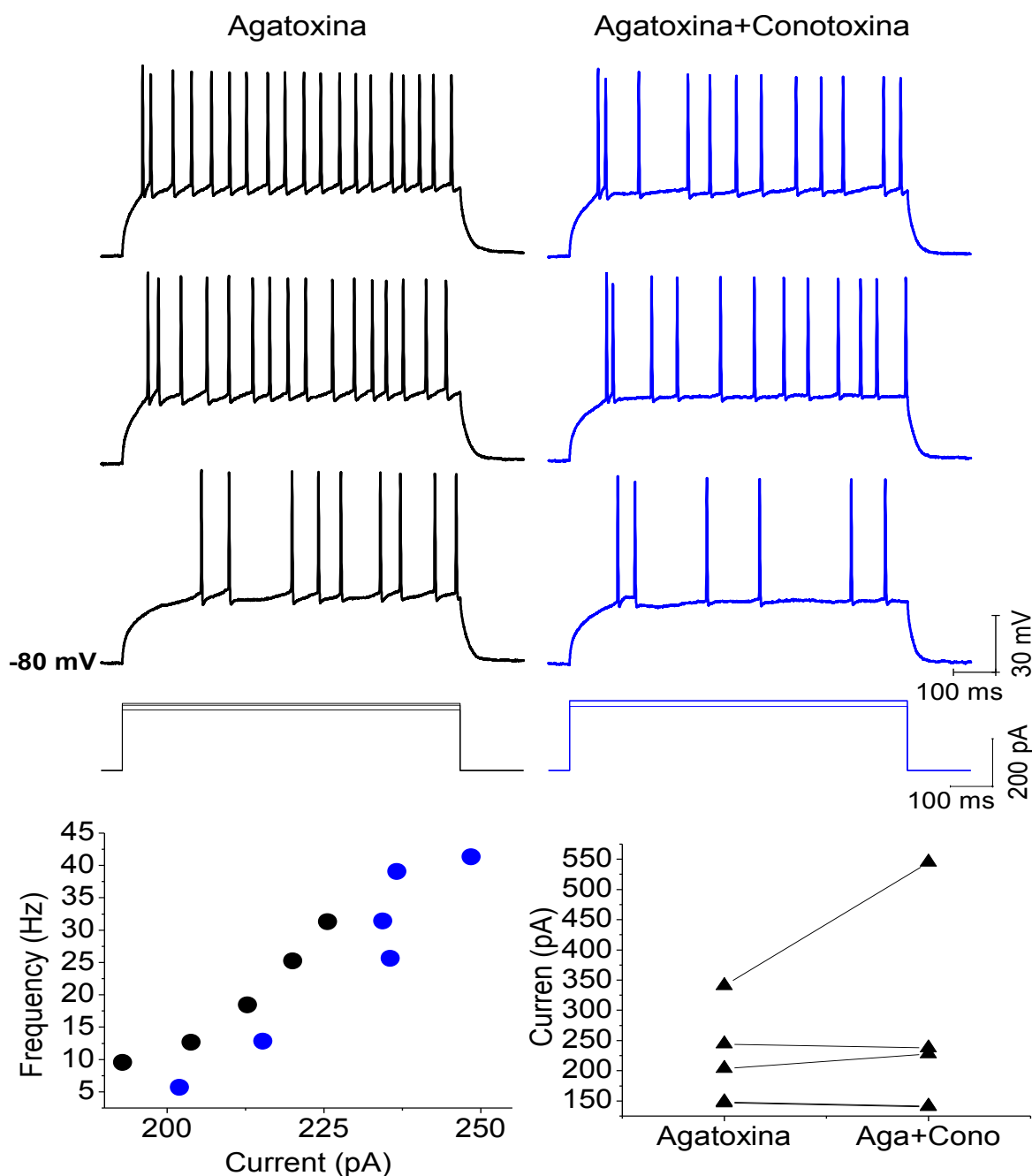
Para establecer la participación de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q se realizó el bloqueo farmacológico a través de la aplicación del antagonista  $\omega$ -agatoxina-TK (400 nM), el cual es específico para este tipo de canales. La aplicación de dicho antagonista tuvo como resultado un incremento en la intensidad de corriente necesaria para alcanzar la misma frecuencia de disparo, siendo que en la condición control se requirió de  $175.45 \pm 28.12$  pA mientras que tras la aplicación de  $\omega$ -agatoxina-TK la corriente necesaria aumento a  $229.23 \pm 31.86$  pA, lo cual indica que en presencia de  $\omega$ -agatoxina-TK hubo una disminución en la frecuencia de disparo la cual fue estadísticamente significativa ( $n= 6$ ,  $P= 0.020$ ), la relación intensidad de corriente / frecuencia de disparo se puede observar la figura 18B. En la figura 18A se muestran la respuesta en voltaje a tres intensidades de corriente en el control (trazos negros) y en presencia de  $\omega$ -agatoxina-TK (trazos azules), en dicha figura se puede notar la disminución en la frecuencia de disparos antes mencionada, así como la disminución en la amplitud del PPH en presencia de la  $\omega$ -agatoxina-TK en comparación con el control.

Con el fin de corroborar si en las NEM de tortuga existe una interacción entre los canales tipo P/Q y N en las NEM de tortuga se realizó el bloqueo farmacológico de los canales N mediante la aplicación de la  $\omega$ -conotoxina-GVIA (1  $\mu$ M), dicha toxina se aplicó 15 a 20 minutos después de haber realizado el bloqueo de los canales tipo P/Q, con el propósito de determinar si el efecto observado en la figura 18 es potenciado por el bloqueo de los canales tipo N, los resultados obtenidos provocaron un aumento significativo ( $n=6$ ,  $P=0.020$ ) en la intensidad de corriente necesaria para evocar la misma frecuencia de disparo en la condición en la cual se encontraban bloqueados únicamente los canales tipo P/Q ( $229.23 \pm 31.86$  pA) respecto a la condición en la cual tanto los canales P/Q y N fueron bloqueados ( $258.53 \pm 74.582$  pA) [figura 19B]. En la condición en la cual se bloquearon los canales P/Q y N se puede notar que hubo una reducción mayor en

la amplitud del PPH en comparación con la condición y control y en la cual sólo se bloquearon los canales P/Q [figuras 18A y 19A].



**Figura 18. Participación de los canales tipo P/Q (Cav2.1) en el patrón de disparo de las NEM de tortuga.** El bloqueo farmacológico de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q mediante la aplicación de  $\omega$ -Agatoxina-TK tuvo como resultado un aumento en la intensidad de corriente necesaria para obtener la misma frecuencia de disparo, en A se muestra la respuesta en voltaje en la condición control (negro) y en presencia de  $\omega$ -Agatoxina-TK (azul) a tres intensidades de corriente similares puede observarse que en la condición experimental se produjo un decremento en la frecuencia de disparo así como una disminución en la amplitud del PPH. En B se muestra la relación I/F en la cual se puede observar un desplazamiento hacia la derecha de los puntos experimentales (en azul) indicando que en la condición experimental se requirió una mayor intensidad de frecuencia para alcanzar la misma frecuencia de disparo que en el control. En C se presenta el cambio en la intensidad de corriente de todos los experimentos.



**Figura 19. Participación de los canales tipo P/Q ( $Ca_v2.1$ ) y N ( $Ca_v2.2$ ) en el patrón de disparo de las NEM de tortuga.** El bloqueo conjunto de los canales P/Q y N mediante  $\omega$ -Agatoxina-TK y  $\omega$ -Conotoxina-GVIA, respectivamente, tuvo como consecuencia una disminución en la frecuencia de disparo así como una mayor disminución en la amplitud del PPH dichos cambios se pueden observar en el panel A. En B se muestra la relación I/F en la cual se puede observar un ligero desplazamiento hacia la derecha de los puntos experimentales (en azul) indicando que en la condición experimental se requirió una mayor intensidad de frecuencia para alcanzar la misma frecuencia de disparo que en el control. En C se presenta el cambio en la intensidad de corriente de todos los experimentos.

## DISCUSIÓN

Una de los objetivos del presente trabajo fue el determinar si las NEM de tortuga comparten las mismas propiedades electrofisiológicas que se han reportado para dicha estirpe neuronal en mamíferos; diversos estudios realizados mediante registros electrofisiológicos de tipo intracelular y registro de fijación de corriente en modalidad de célula entera, han mostrado que las neuronas espinosas medianas de mamífero presentan características electrofisiológicas específicas. Diversos autores [Kawaguchi *et. al.*, 1989; Kita *et. al.*, 1984; Jiang *et. al.*, 1991; Pérez-Garci *et. al.*, 2003] han reportado que en los mamíferos existen una gran variedad de conductancias iónicas involucradas en la generación de dichas características, como lo son el retraso en la aparición del potencial de acción (corriente A de potasio), la rectificación a potenciales depolarizantes e hiperpolarizantes (conductancias *I<sub>rk</sub>* de potasio), la formación del postpotencial hiperpolarizante (PPH) así como la adaptación de la frecuencia de disparo (corrientes de calcio y corrientes de potasio activadas por calcio). En el registro de las NEM de mamífero y tortuga presentados en las figuras 9 y 10 es posible observar todas estas características electrofisiológicas, lo cual indica que en ambos grupos dichas características están dadas por las mismos tipo conductancias iónicas; de hecho los resultados de estudios realizados en tortuga por Barral (2010) muestra que al igual que lo observado en el presente trabajo, las NEM de tortuga comparten las características electrofisiológicas generales con las NEM de mamífero, mientras que estudios realizados Guzmán (2010) muestran que el bloqueo de ciertas conductancias de potasio mediante la aplicación de TEA, 4-AP y cesio produjeron resultados similares en la modificación del patrón de disparo de las NEM de tortuga en comparación con mamíferos.

De acuerdo a lo anterior es posible sugerir que las propiedades electrofisiológicas de las NEM se encuentran altamente conservadas en los diferentes grupos de vertebrados. Tal es el caso de estudio realizados por Ericsson y colaboradores (2011), Farries and Perkel (2000) y Farries y colaboradores (2005) en los cuales se realizó la caracterización electrofisiológica

de las NEM del estriado de lampreas y aves, respectivamente. Los datos arrojados por dichos estudios mostraron que ambos grupos de vertebrados comparten entre ellos y con mamíferos las propiedades electrofisiológicas que caracterizan a este tipo de neuronas.

Debido a que en diferentes grupos de vertebrados las neuronas espinosas medianas presentan las mismas propiedades electrofisiológicas es posible asumir que a lo largo de la evolución de los vertebrados el conjunto de canales iónicos presentes en las NEM se han conservado; sin embargo, el presente trabajo se enfocó en determinar si en los reptiles la generación del patrón de disparo característico de estas neuronas se encuentran involucrados los mismos canales iónicos reportados para mamíferos, de manera específica se buscó la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje.

### **Bloqueo de canales de calcio por medio de cadmio**

En mamíferos diversos estudios han identificado cuales son los canales de calcio que se encuentran relacionados con la generación del patrón de disparo de las NEM, estos canales con canales tipo L, N, P/Q, R [Hoehn *et. al.*, 1993; Bargas *et. al.*, 1994; Foehring *et. al.*, 2000; McRory *et. al.*, 2001]. Sin embargo, en otros grupos de vertebrados los estudios realizados para identificar que canales de calcio se encuentran en estas neuronas son pocos, por lo cual como primer paso se llevaron a cabo los experimentos para corroborar la presencia de canales de calcio en las neuronas espinosas medianas de tortuga para lo cual se utilizó cadmio como bloqueador inespecífico para estos canales. Diversos autores mencionan que el efecto que produce la aplicación del cadmio en el patrón de disparo de las NEM de mamífero es un incremento en la frecuencia de disparo aunado con una disminución en la amplitud del PPH [Galarraga *et. al.*, 1989; Bargas *et. al.*, 1999; Pineda *et. al.*, 1998]; estos efectos observados en mamíferos coinciden con los resultados obtenidos de los experimentos realizados en presencia de cadmio en las NEM de tortuga, por lo cual se puede afirmar que al igual que en mamíferos existen canales de calcio dependientes de voltaje en las NEM de tortuga; sin embargo, los resultados del presente trabajo no sólo



confirman la presencia de canales de calcio sino también que dichas conductancias de calcio presentan un papel similar en la generación del patrón de disparo en ambos grupos de vertebrados, es decir, que en los reptiles al igual que en los mamíferos los canales de calcio tienen un importante papel para que se dé el patrón de disparo de las NEM [Aguilar *et. al.*, 2004; Sánchez-Mejorada *et. al.*, 2009; Barral *et. al.*, 2010].

Estos resultados permiten inferir que los canales de calcio dependientes de voltaje, al igual que con las propiedades electrofisiológicas, están presentes en grupos de vertebrados filogenéticamente inferiores a mamíferos, no obstante a pesar que estos resultados muestran la presencia de canales de calcio en las NEM tortuga no permiten dilucidar de manera específica cuales canales de calcio son los que se expresan en las NEM de tortuga y si la contribución de estos al patrón de disparo concuerda con lo que se ha reportado previamente para mamíferos, por lo cual se realizó el bloqueo farmacológico con toxinas específicas para cada tipo canal de calcio lo cual permitió llevar a cabo una identificación más precisa de estos canales.

### **Identificación de canales $\text{Ca}^{2+}$ mediante bloqueo farmacológico con níquel**

Mediante estudios moleculares y de registro de corrientes se ha sugerido la presencia de canales de calcio tipo T en NEM de mamíferos [Bargas *et. al.*, 1994; McRory *et. al.*, 2001]. Sin embargo, en estas neuronas no sea definido si este tipo de canales participan en la generación del patrón de disparo debido a que pocos son los estudios enfocados en determinar la actividad de este tipo de canales en las neuronas de proyección del estriado y también porque existen pocos bloqueadores específicos para los canales tipo T. Trabajos realizados por Mlinar y Enyeart (1993) en cultivos celulares obtuvieron una reducción significativa en las corrientes de calcio tipo T al utilizar dos concentraciones de níquel 5 y 25  $\mu\text{M}$ ; otro estudio realizado por Lee y colaboradores (1999) mediante la clonación de tres subunidades:  $\alpha 1\text{G}$  ( $\text{Ca}_v3.1$ ),  $\alpha 1\text{H}$  ( $\text{Ca}_v3.2$ ) y  $\alpha 1\text{I}$  ( $\text{Ca}_v3.3$ ) de los canales tipo T comprobaron que las  $\text{IC}_{50}$  de níquel con las cuales se realizó el bloque de cada subtipo de canal tipo T fueron de 250, 12 y 216  $\mu\text{M}$  respectivamente. Asimismo

Kang y colaboradores (2006) reportaron que para bloquear a los canales tipo T, específicamente los  $Ca_v3.2$ , se necesitaron concentraciones de alrededor de los 5  $\mu\text{M}$  de níquel con lo cual se logró reducir alrededor del 50% de la corriente producida por la canales  $Ca_v3.2$ .

Sin embargo, también existen reportes en los que se menciona la presencia de canales de calcio tipo R ( $Ca_v2.3$ ) en las NEM de mamíferos [Foehring *et. al.*, 2000]. Asimismo existen estudios en los que se ha comprobado que los canales tipo R pueden ser bloqueados mediante la aplicación de níquel. Tal es el trabajo realizado por Tottene y colaboradores (2000) utilizando células granulares de cerebelo en cultivo celular donde mostraron que al utilizar una concentración 30  $\mu\text{M}$  de níquel se bloqueó el 50% de la corriente generada por canales tipo R. Otro estudio realizado por Kang y colaboradores (2007) realizando la clonación del canal de calcio tipo R y utilizando concentraciones de níquel de 1-300  $\mu\text{M}$  (obteniendo una  $IC_{50}$  de 14  $\mu\text{M}$ ) bloquearon corrientes de calcio generadas por las canales tipo R y el porcentaje de disminución de las corrientes tipo R se dio de manera dependiente a la concentración (a mayor concentración de níquel mayor disminución de la corriente).

Tomando en cuenta las concentraciones reportadas en todos estos trabajos, con las cuales se logró bloquear las corrientes tipo T y R, y al compararlas con las dos concentraciones de níquel (10 y 100  $\mu\text{M}$ ) utilizadas en este trabajo, puede asumirse que la disminución en la frecuencia de disparo observado en las figuras 12 y 13 se dio como consecuencia del bloqueo de canales tipo T, R o ambos, puesto que las concentraciones utilizadas en el presente trabajo entran en el rango reportado para bloquear de manera efectiva ambos tipos de canales de calcio. No obstante los resultados obtenidos en los experimentos realizados en presencia de níquel pueden no ser concluyentes para determinar si el cambio en patrón de disparo de las NEM de tortuga puede ser atribuidos al bloqueo de canales tipo T, R o a ambos, para lo cual es necesario llevar a cabo experimentos en los cuales se utilicen antagonistas específicos para estos canales de calcio como lo serían la kurtoxina y SNX-482, respectivamente,

con el fin de determinar si el efecto observado se debe a uno o a ambos tipos de canales.

### **Contribución de canales tipo L ( $Ca_v1$ ) al patrón de disparo de las NEM**

La presencia de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L en las NEM en mamíferos ha sido comprobada, así como su participación en el patrón de disparo en el cual se ha visto que al bloquear estos canales mediante el uso de diversas dihidropiridinas las neuronas sufren una disminución en la frecuencia de disparo [Bargas *et. al.*, 1994; Pérez-Garci *et. al.*, 2003], en los resultados del presente trabajo el bloqueo de los canales tipo L mediante nifedipina produjo un efecto similar a lo reportado en mamíferos, observándose no solo una disminución en la frecuencia de disparo sino también en la meseta de disparo. Por el contrario al utilizar el único agonista conocido para los canales tipo L, el Bay-K 8644, se dio una entrada masiva de calcio a la neurona lo que se reflejó como un cambio total en el patrón de disparo (figura 15). En los mamíferos se ha demostrado que la activación de los canales tipo L produce un incremento en la frecuencia de disparo [Pérez-Garci *et. al.*, 2003] y en algunos casos también se presenta la formación de mesetas sobre la cuales se generan potenciales de acción, estos resultados mostrados en mamíferos concuerdan con lo que se observó para las NEM de tortuga.

Debido a que tanto el bloqueo como la activación de los canales de calcio tipo L causó efectos similares en las NEM de tortuga con respecto a lo reportado para mamíferos, es posible asumir que estos canales contribuyen de manera similar a la generación del patrón de disparo característico de las NEM, asimismo es conocido que en las neuronas de proyección del estriado de mamíferos los canales tipo L tienen un importante papel para el establecimiento de los estados “ups” y “downs”, es decir, las fluctuaciones del potencial de membrana de las NEM entre potenciales hiperpolarizados y potenciales despolarizados lo que confiere a estas neuronas una biestabilidad en su membrana, permitiéndole trabajar de manera adecuada en cualquiera de estos estados [Wilson y Kawaguchi, 1996; Vergara *et. al.* 2003; Olson *et. al.* 2005]. Estudios han mostrado que cuando se

bloquean los canales tipo L en las NEM se favorece la aparición de los estados “downs” en los cuales el potencial de membrana se mueve a potenciales muy negativos y por tanto no se generan potenciales de acción; esto puede explicar porque en los resultados del bloqueo de estos canales con nifedipina se dio no sólo una disminución en la frecuencia de disparo sino también una disminución en la meseta de disparo [Hernández-López *et. al.*, 1997; Vergara *et. al.* 2003; Olson *et. al.* 2005], es decir, que el bloqueo de canales tipo L provoca que el potencial de membrana se mantenga en valores más negativos. Ahora en el caso contrario, se ha observado que cuando se aplica el agonista para canales de calcio tipo L, BayK 8644, se facilita la aparición de los estados “up”; en esta condición el potencial de membrana de las NEM se ubica en valores más positivos y por tanto la generación de potenciales de acción se da con mayor facilidad. Si comparamos esto con lo observado tras la aplicación del BayK 8644 en las NEM de tortuga, se podría suponer que la formación de las mesetas observadas, aparte de ser provocadas por una gran entrada de calcio, podrían ser provocadas por la aparición de los estados “up” que presentan las neuronas espinosas medianas [Hernández-López *et. al.*, 1997, 2000; Vergara *et. al.* 2003; Olson *et. al.* 2005]. Estos resultados muestran que al igual que lo reportado para mamíferos en los reptiles los canales de calcio tipo L tienen una contribución similar al patrón de disparo de las NEM, lo cual sugiere que estos canales aparecieron en las NEM en grupos de vertebrados anteriores a mamíferos y que su función se ha mantenido a lo largo de la evolución este grupo.

### **Papel de los canales tipo P/Q ( $Ca_v2.1$ ) y N ( $Ca_v2.2$ ) en el patrón de disparo de las NEM**

Pérez-Garci y colaboradores (2003) menciona que la acción de los canales P/Q y N sobre el patrón de disparo se da principalmente mediante la regulación del postpotencial hiperpolarizante que se presenta en las NEM; asimismo se ha demostrado que en las neuronas espinosas medianas de mamíferos la frecuencia de disparo es controlada principalmente por el PPH, el cual se genera por la activación de canales de potasio dependientes de calcio ( $K_{Ca}$ ) de tipo BK y SK

[Pineda *et. al.*, 1992], como su nombre lo menciona la activación de estos canales requiere que se dé un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio y se ha demostrado que dicho incremento en las concentraciones de calcio se da través de canales tipo P/Q y N. [Vilchis *et. al.*, 2000]. En el presente trabajo el bloqueo de los canales N y P/Q tuvieron efectos completamente diferentes entre ellos y con lo reportado en la literatura; el bloqueo de canales calcio tipo N mediante  $\omega$ -Conotoxina-GVIA (figura 16) no produjo cambio en el PPH, así como la combinación de  $\omega$ -Conotoxina-GVIA más  $\omega$ -Agatoxina-TK (figura 17) tampoco generó cambio alguno en el PPH, mientras que al realizar el bloqueo farmacológico de los canales P/Q mediante  $\omega$ -Agatoxina-TK (figura 18) se dio una disminución en el PPH y la subsecuente aplicación de  $\omega$ -Conotoxina-GVIA (figura 19) produjo una disminución aún mayor del PPH. Dichos resultados muestran que en el caso de las tortugas la entrada de calcio a través de los canales P/Q tiene una mayor importancia para que se dé la activación de los canales de potasio SK y BK, y por consiguiente para que se genere el PPH, esto es contrario a lo que se ha reportado para mamíferos ya que en este grupo de vertebrados se requiere que se bloqueen tanto los canales P/Q como los N para producir un cambio en el PPH [Pérez-Garci *et. al.*, 2003]. Mientras que la participación de los canales de calcio tipo N se dio únicamente cuando se habían bloqueado previamente los canales tipo P/Q, lo cual nos puede indicar que la entrada de calcio a través de los canales tipo N no contribuye de manera significativa a la activación de los canales de potasio SK y BK. Sin embargo, se ha comprobado que en tortuga los canales tipo N tiene una participación importante en la liberación de neurotransmisor [Sánchez-Mejorada *et. al.*, 2009], no obstante en el presente trabajo se muestra que su contribución al patrón de disparo así como la entrada de calcio a través de estos para que se dé la activación de los canales de potasio dependientes de calcio no es significativa.

En las NEM de rata se ha observado que los tanto los canales N y P/Q son susceptibles a ser modulados por la acción de dopamina a través de receptores D2, por acetilcolina por medio de receptores M1 y M4, así como por somatostatina [Pérez-Rosello *et. al.*, 2004; Vilchis *et. al.*, 2002; Galarraga *et. al.*, 2007; Pérez-

Burgos *et. al.*, 2008, 2010], y el efecto en el patrón de disparo provocado por la activación de los receptores a estos neuromoduladores se observa como una disminución en la amplitud del PPH. Esta disminución se da como consecuencia de la disminución en la actividad de los canales tipo N y P/Q, y por consiguiente se da una menor entrada de calcio al interior de la célula evitando de esta manera la activación de los canales de potasio dependientes de calcio, en el caso de las tortugas se puede asumir que los canales de calcio tipo P/Q son el tipo de canal sobre los cuales la modulación por estas sustancias tienen un mayor efecto, debido a que a diferencia de lo reportado para mamíferos, únicamente el bloqueo de los canales tipo P/Q tuvo una disminución importante en el PPH, y el remanente del PPH fue bloqueado después de que se bloquearon los canales tipo N, por lo cual se puede hipotetizar que la regulación sobre los canales tipo N a través de los receptores D2, M1 y M4 no es tan importante como lo es para los canales P/Q [Pérez-Rosello *et. al.*, 2004; Vilchis *et. al.*, 2002; Galarraga *et. al.*, 2007; Pérez-Burgos *et. al.*, 2008, 2010].

Con base en los resultados mostrados en el presente trabajo es posible inferir que las neuronas espinosas medianas de mamífero y tortuga comparten las propiedades electrofisiológicas que definen a esta estirpe neuronas así como los canales de calcio dependientes de voltaje que participan en la generación del patrón de disparo característico de estas neuronas. Sin embargo, las diferencias encontradas, principalmente, en la contribución de los canales de calcio tipo N y P/Q entre mamíferos y reptiles podrían reflejar que en mamíferos existe un mayor especialización en cuanto al control del movimiento, esto quizás porque en los mamíferos las conductas motoras requieren de una mayor coordinación. A pesar de estas diferencias encontradas es posible inferir que las propiedades electrofisiológicas se han conservado a lo largo de la evolución, lo cual indica que el sistema de los ganglios basales está altamente conservado, no sólo en los aspectos anatómicos como ya se ha reportado por numerosos trabajos, sino también en las cuestiones electrofisiológicas.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible realizar las siguientes conclusiones:

- Las neuronas espinosas medianas de tortuga y mamífero comparten las mismas propiedades electrofisiológicas, las cuales están dadas por las mismas conductancias de calcio.
- El patrón de disparo de las NEM de tortuga es controlado mediante la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, de manera similar a lo que se ha reportado para los mamíferos.
- En las NEM de tortuga se comprobó la presencia de canales de calcio tipo L, N y P/Q, y los resultados de este trabajo sugieren la posible presencia canales tipo T y/o R.
- Al igual que en mamíferos el bloqueo de canales tipo L produjo una disminución en la frecuencia de disparo mientras que la activación de este tipo de canales cambio el patrón de disparo de una patrón de disparo repetitivo a un disparo en mesetas.
- Los canales tipo P/Q participan de manera directa en el control del patrón de disparo de las NEM de tortuga, específicamente en la generación del PPH, mientras que los canales tipo N no contribuyen de manera directa a la formación del PPH ni al patrón de disparo característico de las NEM en tortuga.

## LITERATURA CITADA

1. Aguilar, J. Escobedo, L. Bautista, W. Felix, R. Delgado-Lezama, R. 2004. N- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels regulate synaptic efficacy between spinal dorsolateral funiculus terminals and motoneurons. *Biochem Biophys Res Com.* 317: 551-557.
2. Arias-García, M. A. Tapio, D. Flores-Barrera, E. Pérez-Ortega, J.E. Bargas, J. Galarraga, E. 2013. Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Frontiers in Systems Neuroscience.* 7: 1-11.
3. Bargas, J. Ayala, G.X. Vilchis, C. Pineda, J.C. Galarraga, E. 1999.  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated Outward Currents in Neostriatal Neurons. *Neuroscience.* 88(2): 479–488.
4. Bargas, J. Galarraga, E. Aceves, J. 1989. An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res.* 75: 146-56.
5. Bargas, J. Howe, A. Eberwine, J, Cao, Y. Sumeier, D.J. 1994. Cellular and Molecular Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  Currents in Acutely Isolated, Adult Rat Neostriatal Neurons. *The Journal of Neuroscience.* 14(11): 6667-6666.
6. Barral, J. Galarraga, E. Tapia, D. Flores-Barrera, E. Reyes, A. Bargas, J. 2010. Dopaminergic Modulation of Spiny Neurons in the Turtle Striatum. *Cell Mol Neurobiol* 30: 743-750.
7. Berkefeld, H. Fakler, B. Schulte, U. 2010.  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated K Channels: From Protein Complexes to Function. *Physiol Rev.* 90: 1437–1459.
8. Catterall, W.A. 2000. Structure And Regulation Of Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 521-555.
9. Catterall, W.A. 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1-24.



10. Catterall, W.A. Perez-Reyes, E. Snuth, T.P. Striessnig, J. 2005. Nomenclature And Relationships Of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57:411–425.
11. Dolphin, A.C. Huston, E. Scott, R.H. 1990. Direct and indirect modulation of neuronal calcium currents by G-protein activation. *Biochem Soc Symp.* 56: 46-60.
12. Dudman, J.T. Gerfen, C.R. 2015. The Basal Ganglia. En: Paxinos, G. *The Rat Nervous System*. 4° ed. Ed. Academic Press. pp. 391-440.
13. Endepols, H. Helmbold, F. Walkowiak, W. 2007. GABAergic projection neurons in the basal ganglia of the green tree frog (*Hyla cinerea*). *Brain Research*. 1138: 76-85.
14. Ericsson, J. Silberberg, G. Robertson, B. Wikström, M.A. Grillner, S. 2011. Striatal cellular properties conserved from lampreys to mammals. *J Physiol*. 589(12): 2979-2992.
15. Ericsson, J. Stephenson-Jones, M. Kardamakis, A. Robertson, B. Silberberg, G. Grillner, S. 2013. Evolutionarily conserved differences in pallial and thalamic short-term synaptic plasticity in striatum. *J Physiol* 591: 859-874.
16. Faber, L. Sah, P. 2003. Calcium-Activated Potassium Channels: Multiple Contributions to Neuronal Function. *The Neuroscientist*. 9(3): 181-194.
17. Farries, M.A. Meitzen, J. Perkel, D.J. 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 Neurophysio*. 94:454-467.
18. Farries, M.A. Perkel, D.J. 2000. Electrophysiological properties of avian basal ganglia neurons recorded in vitro. *J. Neurophysiol*. 84(5): 2502-13.
19. Foehring, R.C. Mermelstein, P.G. Song, W.J. Ulrich, S. Surmeier, D.J. 2000. Unique Properties of R-Type Calcium

- Currents in Neocortical and Neostriatal Neurons. *J Neurophysiol.* 84(5): 2225-36.
20. Galarraga E., Bargas J., Sierra A., Aceves J. 1989. The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* 75: 157-168.
  21. Galarraga, E. Pacheco-Cano, M.T. Flores-Hernández, J.V. Bargas, J. 1994. Subthreshold rectification in neostriatal spiny projections neurons. *Exp Brain Res.* 100(2): 239-49.
  22. Galarraga, E. Vilchis, C. Tkatch, T. Salgado, H. Tecuapetla, F. Perez-Rosello, T. Perez-Garci, E. Hernandez-Echeagaray, E. Surmeier, D. J. Bargas, J. 2007. Somatostatinergic Modulation of Firing Pattern and Calcium-Activated Potassium Currents in Medium Spiny Neostriatal Neurons. *Neuroscience* 146: 537–554.
  23. Gerfen, C. 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience.* 2(9): 157-158.
  24. Gerfen, C.R. Bolam, P. 2010. The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. En: Steiner, H. Tseng, K.Y. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function.* Ed. Academic Press. pp. 3-28.
  25. Grillner, S. Robertson, B. Stephenson-Jones, M. 2013. The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action selection. *J Physiol* 591: 5425–5431.
  26. Guzmán, B.A. 2010. 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. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
  27. Hammond, C. 2008. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 3° ed. Ed. Academic Press. pp. 417.
  28. Hernández-López, S. Bargas, J. Surmeier, D.J. Reyes, A. Galarraga, E. 1997. D1 Receptor Activation Enhances Evoked

- Discharge in Neostriatal Medium Spiny Neurons by Modulating an L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Conductance. *J Neurosci* 17(9): 3334-3342.
29. Hernández-López, S. Tkatch, T. Perez-Garci, E. Galarraga, E. Bargas, J. Hamm, H. Surmeier, D.J. 2000. D2 Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Currents and Excitability via a Novel PLC $\beta$ 1-IP3-Calcineurin-Signaling Cascade. *J. Neurosci.* 20(24):8987-8995.
  30. Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 3<sup>a</sup> ed. Ed. Sinauer Associates. pp. 131.
  31. Hoehn, K. Watson, T.W. J. MacVicar, B. A. 1993. Multiple Types of Calcium Channels in Acutely Isolated Rat Neostriatal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 13(3): 1244-1257.
  32. Jiang, Z.G. North, R.A. 1991. Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurons in vitro. *J. Physiol.* 443: 533-553.
  33. Kang, H.W. Moona, H.J. Joob, S.H. Lee, J.H. 2007. Histidine residues in the IS3-IS4 loop are critical for nickel-sensitive inhibition of the  $\text{Ca}_v2.3$  calcium channel. *FEBS Letters*. 581(30): 5774-5780.
  34. Kang, H.W. Park, J.Y. Jeong, S.W. Kim, J.A. Moon, H.J. Perez-Reyes, E. Lee, J.H. 2006. A Molecular Determinant of Nickel Inhibition in  $\text{Ca}_v3.2$  T-type Calcium Channels. *J Biol Chem*. 281(8): 4823-4830.
  35. Kawaguchi, Y. Wilson, C.J. Emson, P.C. 1989. Intracellular Recording of Identified Neostriatal Patch and Matrix Spiny Cells in a Slice Preparation Preserving Cortical Input. *J Neurophysiol*. 62(5): 1052-1068.
  36. Kita, T. Kita, H. Kitai, S.T. 1984. Passive Electrical Membrane Properties of Rat Neostriatal Neurons in an In Vitro Slice Preparation. *Brain Research*. 300: 129-139.

37. Lacinová, L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 1: 1-78.
38. Lee, J.H. Gomora, J.C. Cribbs, L.L. Perez-Reyes, E. 1999. Nickel Block of Three Cloned T-Type Calcium Channels: Low Concentrations Selectively Block  $\alpha 1H$ . *Biophysical Journal.* 77: 3034–3042.
39. Leuchtag, H.R. 2008. Voltage-Sensitive Ion Channels *Biophysics of Molecular Excitability.* Ed. Springer. pp.
40. Luján, R. 2010. Organization of potassium channels on the neuronal surface. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 40: 1-20.
41. Maier, S. Walkowiak, W. Luksch, H. Endepols, H. 2010. An indirect basal ganglia pathway in anuran amphibians? *Journal of Chemical Neuroanatomy* 40: 21-35.
42. Marín, O. Smeets, W.J.A.J. González, A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS.* 21:487-494.
43. McRory, J.E. Santi, C.M. Hamming, K.S.C. Mezeyova, J. Sutton, K.G. Baillie, D.L. Stea, A. Snutch, T.P. 2001. Molecular and Functional Characterization of a Family of Rat Brain T-type Calcium Channels. *J Biol Chem.* 276(6): 3999–4011.
44. Mlinar, B. Enyeart, J.J. 1993. Block of Current Through T-Type Calcium Channels by Trivalent Metal Cations and Nickel in Neural Rat And Human Cells. *Journal of Physiology.* 469: 639-652.
45. Monteil, A. Chemin, J. Bourinet, E. Mennessier, G. Lory, P. Nargeot, J. 2000. Molecular and functional properties of the human  $\alpha_{1G}$  subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem.* 275(9): 6090-100.
46. Monteil, A. Chemin, J. Leuranguer, V. Altier, C. Mennessier, G. Bourinet, E. Lory, P. Nargeot, J. 2000. Specific properties of T-

- type calcium channels generated by the human  $\alpha_{11}$  subunit. *J Biol Chem.* 275(22): 16530-5.
47. Moreno, D.H. 1999. Molecular and Functional Diversity of Voltage-Gated Calcium Channels. *Annals New York Academy Of Sciences.* 102-117.
  48. Nisenbaum, E.S. Berger, T.W. 1992. Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs--I. In vivo analysis. *Neuroscience.* 48(3): 561-78.
  49. Nisenbaum, E.S. Wilson, C.J. 1995. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci.* 15:4449- 4463.
  50. Olson P.A. Tkatch, T. Hernandez-Lopez, S. Ulrich, S. Ilijic, E. Mugnaini, E. Zhang H. Bezprozvanny, I. Surmeier, D.J. 2005. G-Protein-Coupled Receptor Modulation of Striatal CaV1.3 L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Is Dependent on a Shank-Binding Domain. *J. Neurosci.* 25(5):1050 –1062.
  51. Pérez-Burgos, A. Pérez-Rosello, T. Salgado, H. Flores-Barrera, E. Prieto, G. A. Figueroa, A. Galarraga E. Bargas, J. 2008. Muscarinic M1 Modulation of N and L Types of Calcium Channels is Mediated by Protein Kinase C in Neostriatal Neurons. *Neuroscience* 155: 1079–1097.
  52. Pérez-Burgos, A. Prieto, G. A. Galarraga, E. Bargas, J. 2010. Ca<sub>v</sub>2.1 Channels are Modulated by Muscarinic M1 Receptors Through Phosphoinositide Hydrolysis in Neostriatal Neurons. *Neuroscience* 165: 293–299.
  53. Pérez-Garci, E. Bargas, J. Galarraga, E. 2003. The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport.* 14(9): 1253-1256.
  54. Perez-Reyes, E. Cribbs, L.L. Daud. A. Lacerda, A.E. Barclay, J. Williamson, M.P. Fox, M. Rees, M. Lee, J.H. 1998. Molecular

- characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*. 391(6670): 896-900.
55. Pérez-Rosello, T. Figueroa, A. Salgado, H. Vilchis, C. Tecuapetla, F. Guzman, J.N. Galarraga, E. Bargas, J. 2004. Cholinergic Control of Firing Pattern and Neurotransmission in Rat Neostriatal Projection Neurons: Role of  $Ca_v2.1$  and  $Ca_v2.2$   $Ca^{2+}$  Channels. *J Neurophysiol* 93: 2507–2519.
  56. Pineda, J.C. Galarraga, E. Bargas, J. Cristancho, M. Aceves, J. 1992. Charybdotoxin and Apamin Sensitivity of the Calcium-Dependent Repolarization and the Afterhyperpolarization in Neostriatal Neurons. *Journal Of Neurophysiology*. 68(1): 287-294.
  57. Pineda, J.C. Water, R.S. Foehring, R.C. 1998. Specificity in the Interaction of HVA  $Ca^{2+}$  Channel Types with  $Ca^{2+}$ Dependent AHPs and Firing Behavior in Neocortical Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol*. 79: 2522-2534.
  58. Purves, D. Augustine, G.J. Fitzpatrick, D. Hall, W.C. LaMantia, A.S. McNamara, J.O. Williams, S.M. 2004. *NEUROSCIENCE*. 3<sup>o</sup>ed. Ed. Sinauer Associates.
  59. Randall, A.D. Tsien, R.W. 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology*. 36(7): 879-93.
  60. Reiner, A. 2002. Functional circuitry of the avian basal ganglia: Implications for basal ganglia organization in stem amniotes. *Brain Research Bulletin*. 57: 513-528.
  61. Reiner, A. 2007. The Evolution of the Basal Ganglia in Mammals and Other Vertebrates. En: Kaas, J.H. *Evolution of Nervous Systems*. Ed. Academic Press. pp. 397-411.
  62. Reiner, A. 2010. The Conservative Evolution of the Vertebrate Basal Ganglia. En: Steiner, H. Tseng, K.Y. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Ed. Academic Press. pp. 29-62

63. Reiner, A. Medina, L. Veenman, C.L. 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev.* 28: 235-285.
64. Sánchez-Mejorada, E. Sánchez-Mondragon, G. Pineda, J.C. González, M. Barral. J. 2009. N-Type Calcium Channels Mediate a GABA<sub>B</sub> Presynaptic Modulation in the Corticostriatal Synapse in Turtle's Paleostriatum Augmentatum. *SYNAPSE* 63: 855–862.
65. Siegelbaum, S.A. Koester, J. 2000. Ion Channels. En: Kandel, E.R. Schwartz, J.H. Jessell, T.M. *Principles of Neural Science.* 4<sup>o</sup>ed. Ed. McGraw-Hill. pp.
66. Snutch, T.P. 2009. Voltage-Gated Calcium Channels. En: Squire, L.R. *Encyclopedia of Neuroscience.* Ed. Elsevier. pp. 427-441.
67. Stephenson-Jones, M. Ericsson, J. Robertson, B. Silberberg, G. Grillner, S. 2012. Evolution of the Basal Ganglia: Dual-Output Pathways Conserved Throughout Vertebrate Phylogeny. *The Journal of Comparative Neurology.* 520:2957–2973.
68. Stephenson-Jones, M. Samuelsson. Ericsson, J. Robertson, B. Silberberg, G. Grillner, S. 2011. Evolutionary Conservation of the Basal Ganglia as a Common Vertebrate Mechanism for Action Selection. *Current Biology.* 21: 1081-1091.
69. Suppiramaniam, V. Abdel-Rahman, E.A. Buabeid, M.A. Parameshwaran, K. 2010. Ion Channels. *Organelles and Cells in Neural Tissues.* 11: 155-181.
70. Tottene, A. Volsen, S. Pietrobon, D. 2000.  $\alpha_{1E}$  Subunits Form the Pore of Three Cerebellar R-Type Calcium Channels with Different Pharmacological and Permeation Properties. *J. Neurosci.* 20(1): 171-178.

71. Tsien, R.W. Ellinor, P.T. Horne, W.A. 1991. Molecular diversity of voltage dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Trends Pharmacol Sci.* 12(9): 349-54.
72. Tsien, R.W. Lipscombe, D. Madison, D.V. Bley, K.R. Fox, A.P. 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *TINS* 11(10): 431-438.
73. Vergara, R. Rick, C. Hernández-López, S. Laville, J. A. Guzman, J. N. Galarraga, E. Surmeier, D. J. Bargas, J. 2003. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol.* 553(1): 169–182.
74. Vilchis, C. Bargas, J. Ayala, G.X. Galván, E. Galarraga, E. 2000.  $Ca^{2+}$  channels that activate  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  currents in neostriatal neurons. *Neuroscience.* 95(3): 745-752.
75. Vilchis, C. Bargas, J. Pérez-Roselló, T. Salgado, H. Galarraga, E. 2002. Somatostatin Modulates  $Ca^{2+}$  Currents In Neostriatal Neurons. *Neuroscience.* 109(3): 555-67.
76. Vogalis, F. Storm, J.F. Lancaster, B. 2003. SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *European Journal of Neuroscience.* 18: 3155-3166.
77. Wilson, C.J. 2004. Basal Ganglia. En: Sheperd, G.M, *The Synaptic Organization of the Brain.* 5<sup>o</sup>ed. Ed. University Press. pp. 361-413.
78. Wilson, C.J. Kawaguchi Y. 1996. The Origins of Two-State Spontaneous Membrane Potential Fluctuations of Neostriatal Spiny Neurons. *J. Neurosci.* 16(7):2397-2410.
79. Yunker, A.M.R. McEnery, M.W. 2003. Low-Voltage-Activated (“T-Type”) Calcium Channels in Review. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 35(6): 533-575.