



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

IDENTIFICACIÓN DEL PAPEL DE LOS CANALES
DE K^+ DEPENDIENTES DE Ca^{2+} EN LA SINAPSIS
CORTICOESTRIATAL DE RATA (*Rattus
norvegicus*).

T E S I S

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta:

Ángel Abdiel Robles Gómez

Vo. Bo. DR. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO
Tutor

--Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2017--





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo Proyectos a Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [Proyecto IN212515]** 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**. Asimismo, se recibió una beca para el desarrollo de esta Tesis por parte del Proyecto PAPIIT **IN223116** de la **Dra. Ana Vega**.

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 Agosto de 2015 a Marzo de 2017.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero

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

La materia, por organizada que se encuentre, no es capaz de producir un solo pensamiento que le permita comprenderse a sí misma, igual que nunca se vería –como sugiere André Frossard– que un triángulo, después de un extraordinario proceso evolutivo, advirtiera de repente, maravillado, que la suma de sus ángulos internos es igual a 180 grados.

-A. Muntané, M. Moro, E. Moros

Agradecimientos

A mis padres Víctor Robles Rangel y Martha Laura Gómez Valladolid, que lo dan todo y han luchado por mí; gracias por sus oraciones, por creer en mí y, sobre todo, por su amor.

A mis hermanos: Xóchitl, que nunca me dejó solo en tiempos difíciles y has sido un modelo de superación; a Edrei y Ameyatzin que me han guiado en muchas decisiones y dudas difíciles.

A mis amigos de toda la carrera: Azareth, Jessica, Julio, Kevin y Lizbeth. Gracias por las locuras, las aventuras y por su amistad en los momentos difíciles que pasamos juntos.

A mis amigos del laboratorio: Carolina, Daniela, Héctor, Gustavo y Raul. No sólo por enseñarme todo lo que saben y darme su cálida amistad, sino por darle vida a la aparentemente aburrida vida de laboratorio.

Al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, por su paciencia, tiempo, comprensión y el gran esfuerzo que ha empeñado en este y muchos otros proyectos. Su trabajo no es en vano, pues trasciende las vidas de sus alumnos.

A las doctoras Ana, Bertha y Mónica, y al Dr. Manuel por su tiempo, paciencia y apoyo para este trabajo.

Al que está detrás de todo lo que existe, el Diseñador de lo que estudiamos y tratamos de controlar; malentendido e ignorado por muchos, reconocido por minorías.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
LA SINAPSIS.....	9
TRANSMISIÓN SINÁPTICA	11
MODULACIÓN PRESINÁPTICA.....	13
Canales de Ca ²⁺ presinápticos	14
Canales de K ⁺ presinápticos.....	15
CANALES DE K ⁺ DEPENDIENTES DE Ca ²⁺	16
Canales K _{Ca} 1 o BK.....	16
Canales K _{Ca} 2 o SK.....	18
Importancia de los canales K _{Ca} presinápticos.....	20
GANGLIOS BASALES.....	20
Circuito básico de los GB	21
El estriado	23
Sinapsis corticoestriatal.....	25
ANTECEDENTES.....	26
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
HIPÓTESIS.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
ORGANISMOS	29
REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO	29
FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO	29

PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	30
RESULTADOS.....	32
IDENTIFICACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEMS	32
PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K ⁺ Y Ca ²⁺ EN LA LIBERACIÓN	33
PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES BK.....	35
PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES SK.....	37
DISCUSIÓN	38
LA FPP COMO MÉTODO PARA DETERMINAR FACTORES PRESINÁPTICOS	38
LA IMPORTANCIA DE LOS CANALES BK: PRESENCIA A NIVEL PRESINÁPTICO Y POSTSINÁPTICO.....	39
LOS CANALES SK EN LA SINAPSI CORTICOESTRIATAL	41
CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS.....	45

ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazolepropiónico
CaM	Calmodulina
CaMBD*	Sitio de unión a la calmodulina
CTX	Caribdotoxina
DPP	Depresión por pulsos pareados
DPS	Densidad postsináptica
FPP	Facilitación por pulsos pareados
GABA*	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
IbTX	Iberiotoxina
NEM	Neurona espinosa mediana
NMDA*	Ácido <i>N</i> -metil-D-aspartico
NPF	Núcleo parafascicular
NST	Núcleo subtalámico
PPHc	Postpotencial hiperpolarizante corto
PPHm	Postpotencial hiperpolarizante mediano
EPSP*	Potencial postsináptico excitatorio
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
TEA	Tetraetilamonio
RCK	Sitio regulador de conductancia de potasio

*por sus siglas en inglés

RESUMEN

En las terminales nerviosas, con la llegada de un estímulo adecuado, se libera el neurotransmisor a la hendidura sináptica; sin embargo, la cantidad de neurotransmisor que se libera es variable. Esto se debe principalmente a que la liberación es susceptible de ser modulada por la activación de receptores presinápticos.

Es generalmente aceptado que los efectores finales de la modulación presináptica son los canales de Ca^{2+} , los canales de K^+ y la propia maquinaria de liberación. En los últimos años se ha investigado la presencia y la participación presináptica de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}) en algunas sinapsis del SNC de mamíferos, debido a que su sensibilidad al Ca^{2+} les podría otorgar una función regulatoria sobre la liberación; sin embargo, la presencia funcional de estos canales a nivel presináptico no se ha demostrado en la sinapsis corticoestriatal.

Por lo que, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar la participación de los canales K_{Ca} sobre la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal.

Se utilizaron ratas juveniles (14-16 d) previamente anestesiadas para la obtención de rebanadas parasagitales de cerebro, y se llevó a cabo el protocolo de facilitación por pulsos pareados (FPP), utilizando la técnica de registro electrofisiológico *patch-clamp* en la modalidad *whole-cell*. Se midió el cambio en la FPP en presencia de bloqueadores inespecíficos para canales de K^+ y Ca^{2+} , así como específicos para canales BK y SK para determinar su efecto presináptico; también se registró el disparo repetitivo de potenciales de acción para evaluar el efecto postsináptico.

Utilizando bloqueadores específicos para los canales K_{Ca} : BK (iberiotoxina) y SK (apamina), se observó una disminución en la FPP producido por el bloqueo de los canales BK, pero no por el bloqueo de los SK. También se confirmó el papel que los canales K_{Ca} tienen a nivel postsináptico, modificando el patrón de disparo de las neuronas espinosas medianas (NEMs).

Los resultados sugieren que de los canales K_{Ca} , sólo los canales BK se encuentran en la presinapsis y modulan la liberación de glutamato, debido a que su bloqueo específico produjo una disminución en la FPP. Sin embargo, ambos grupos, los canales BK y SK, ofrecen un efecto inhibitorio sobre la excitabilidad de las NEMs. Con base a estas contribuciones funcionales en la sinapsis corticoestriatal, los canales K_{Ca} podrían ser vistos como moduladores débiles, en comparación con otras familias de canales iónicos.

Palabras clave: sinapsis corticoestriatal, modulación presináptica, facilitación por pulso pareado, canales iónicos presinápticos, canales K_{Ca} .

INTRODUCCIÓN

LA SINAPSIS

Las sinapsis son sitios donde se establecen contactos entre dos células a través de especializaciones de la membrana plasmática; en estas regiones se lleva a cabo la transmisión de la información. Las sinapsis se componen de dos elementos: el elemento presináptico que produce y transmite la información, y el elemento postsináptico que recibe el mensaje. Existen dos tipos de sinapsis en función de la manera en que se transmite la información: las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas [Shepherd, 2004].

En las sinapsis eléctricas se establecen contactos estrechos entre las membranas de ambas neuronas. Entre las dos membranas pre- y postsinápticas se forman uniones comunicantes; estas uniones permiten una continuidad tanto eléctrica como química entre el citoplasma de las dos células. Debido a esta condición, es posible el movimiento de corrientes iónicas provenientes de la célula presináptica, las cuales provocan la despolarización o hiperpolarización inmediata de la membrana de la célula postsináptica. El flujo de información en las sinapsis eléctricas puede ocurrir en ambos sentidos. Además, es posible el transporte de otras moléculas cuyo tamaño no rebase el diámetro del poro [Kandel y Siegelbaum, 2000].

Las sinapsis químicas son asociaciones entre dos células excitables en donde una molécula o mensajero químico (neurotransmisor) es liberado del elemento presináptico, y este mensajero es a su vez recibido por el elemento postsináptico a través de receptores químicos específicos; a diferencia de las sinapsis eléctricas, en las sinapsis químicas no están involucradas las uniones comunicantes que permitan el flujo de potenciales eléctricos.

En las sinapsis químicas el espacio extracelular que separa a los dos elementos es de alrededor de 30 nm, y la transmisión de la información en la mayoría de los casos es unidireccional. Cada elemento de la sinapsis está morfológica y fisiológicamente especializado para efectuar la tarea que le corresponde: mientras que el elemento presináptico se dedica a traducir las señales eléctricas en la membrana, a químicas mediante la liberación del neurotransmisor, el elemento postsináptico se especializa en recibir el mensaje y traducirlo de nuevo a una señal eléctrica [Shepherd, 2004] (ver Figura 1).

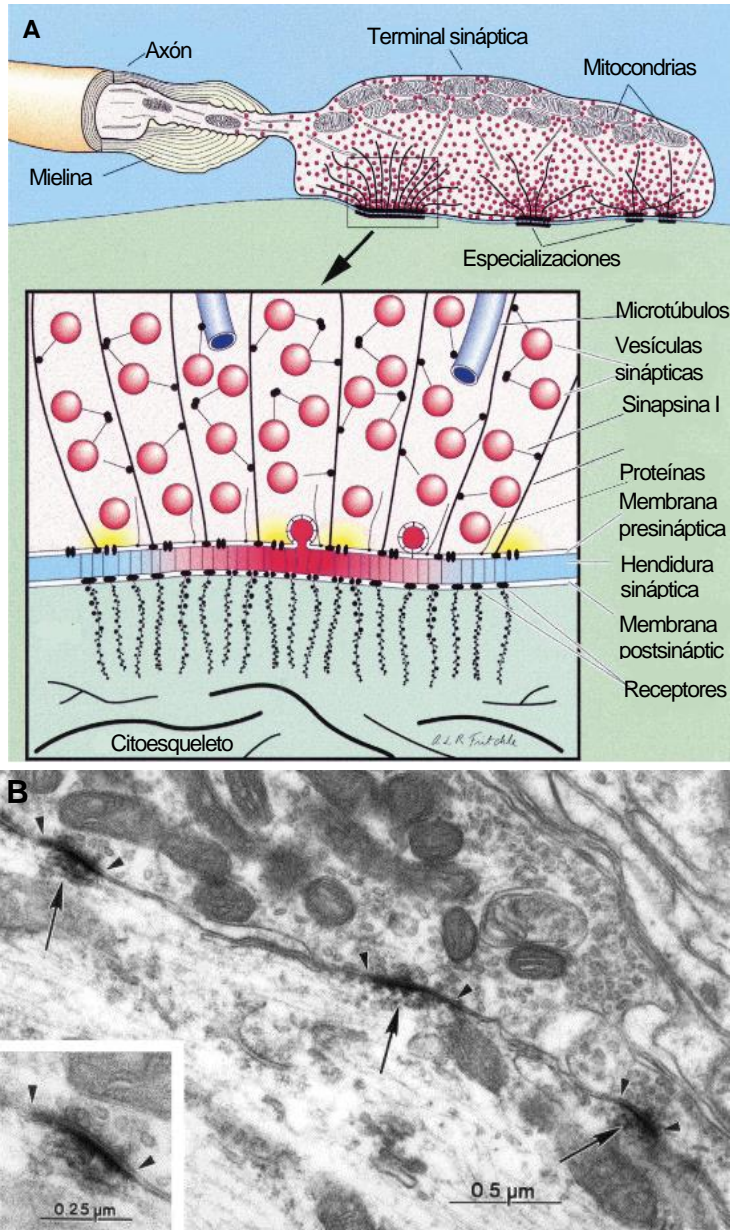


Figura 1. Modelo general de la sinapsis química. El esquema en **A** muestra una sinapsis en donde se aprecia claramente al elemento presináptico como una terminal que se deriva del axón de una neurona. En la terminal sináptica se observa una gran cantidad de vesículas, junto con un arreglo peculiar del citoesqueleto para favorecer el transporte de estas vesículas hacia los sitios destinados a la liberación. Las proteínas como la sinapsina I, junto con otros complejos que se encuentran en la membrana plasmática, se encargan del anclaje y preparación de las vesículas. En la presinapsis también se encuentran mitocondrias y otros organelos importantes para el metabolismo en general. En el contacto estrecho entre las dos membranas, existe un cierto número de especializaciones sinápticas que están compuestas de un sitio activo presináptico en contraposición con una densidad postsináptica. En la membrana postsináptica se representan DPSs donde se encuentran receptores ionotrópicos y metabotrópicos que reciben y se unen al neurotransmisor de manera específica; en la DPS también se encuentran complejos proteicos que están involucrados en la regulación de la actividad de los receptores. En la micrografía que se muestra en **B** se aprecia la sinapsis de una motoneurona. En el botón sináptico se puede distinguir una gran cantidad de vesículas y de mitocondrias. Tanto el sitio activo, como la densidad postsináptica, son identificadas fácilmente por su alta electrodensidad (flechas grandes), la cual se relaciona con la cantidad de proteínas existentes en estas zonas. Modificado de Walmsley, Alvarez, y Fyffe, 1998.

En principio, el elemento presináptico contiene toda la maquinaria molecular necesaria para sintetizar, almacenar y liberar el neurotransmisor al exterior a manera de una exocitosis altamente regulada. El neurotransmisor es sintetizado y almacenado en las vesículas sinápticas, las cuales se encuentran ancladas al citoesqueleto, que mantiene un arreglo peculiar para facilitar la movilización de las vesículas sinápticas hacia ciertos lugares de la membrana plasmática que están especializados para la exocitosis [Walmsley, Alvarez y Fyffe, 1998]. En estos lugares, nombrados sitios activos, las vesículas sinápticas son ancladas a la membrana y preparadas para liberar su contenido; tanto la movilización de las vesículas, como la liberación del transmisor, es llevada a cabo por distintos complejos proteínicos que se encuentran asociados a las vesículas

o a la membrana plasmática [Hammond, 2008]. En la cercanía de esta maquinaria proteica también se encuentran canales iónicos asociados a la membrana plasmática que tienen un papel indispensable tanto en el proceso de la liberación (canales de Ca^{2+}), como en su modulación (canales de Ca^{2+} y K^+) [Engelman y MacDermott, 2004; Hammond, 2008].

En relación al elemento postsináptico, su membrana plasmática está justo enfrente del o de los sitios activos presinápticos, y presenta estructuras denominadas densidades postsinápticas (DPSs), que contienen una considerable cantidad de receptores químicos acoplados a un canal iónico (receptores ionotrópicos). Estos receptores son activados específicamente por el neurotransmisor que es liberado desde la presinapsis. Los receptores reciben y traducen el mensaje químico a una señal eléctrica mediante la apertura del poro del canal y la generación de corrientes iónicas a través de la membrana. En esta región también existen receptores metabotrópicos (no acoplados a un canal iónico) cuya función no forma parte de la transmisión sináptica estrictamente, sin embargo están involucrados en la modulación postsináptica [Siegelbaum, Clapham y Swchartz, 2013].

TRANSMISIÓN SINÁPTICA

En el sistema nervioso (SN) las neuronas conforman circuitos neurales principalmente a través del establecimiento de sinapsis químicas; estos circuitos son la base del procesamiento de la información, la cual se transmite mediante un proceso complejo [Shepherd, 2004]. En general, la transmisión sináptica se puede resumir como el acarreo de información a través de un mediador químico entre dos neuronas, involucrando la traducción de una señal eléctrica presináptica a una química (el neurotransmisor), y posteriormente la recepción y traducción de esta señal química a una nueva señal eléctrica postsináptica. Este proceso se puede resumir en los siguientes pasos (Figura 2) [Augustine, 2001]:

1. El proceso inicia cuando un potencial de acción llega a la terminal sináptica, provocando la despolarización de la membrana.
2. Los canales iónicos de Na^+ y Ca^{2+} dependientes al voltaje que estén presentes son activados de tal forma que se generan corrientes entrantes de estos cationes que despolarizan la membrana.
3. Por la depolarización, se incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), generalmente de menos de 100 nM hasta alrededor de 1 μM , en términos de calcio libre,

durante fracciones de milisegundos en las regiones membranales donde haya mayor densidad de canales de Ca^{2+} , que se les denomina dominios de Ca^{2+} .

4. En la vecindad de estos dominios de Ca^{2+} se encuentran sitios activos que presentan proteínas encargadas de la liberación, las cuales son activadas por el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El Ca^{2+} , entre otras funciones, favorece la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la exocitosis su contenido hacia la hendidura sináptica.
5. La despolarización durante el potencial de acción también activa canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v), así como canales rectificadores retardados y los dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}). Estos canales repolarizan e hiperpolarizan la membrana, impidiendo la apertura, o, de estar abiertos, disminuyendo el tiempo de apertura de los canales de Ca^{2+} , impidiendo el aumento en la concentración intracelular de este catión y frenando la liberación del contenido vesicular a la hendidura sináptica.

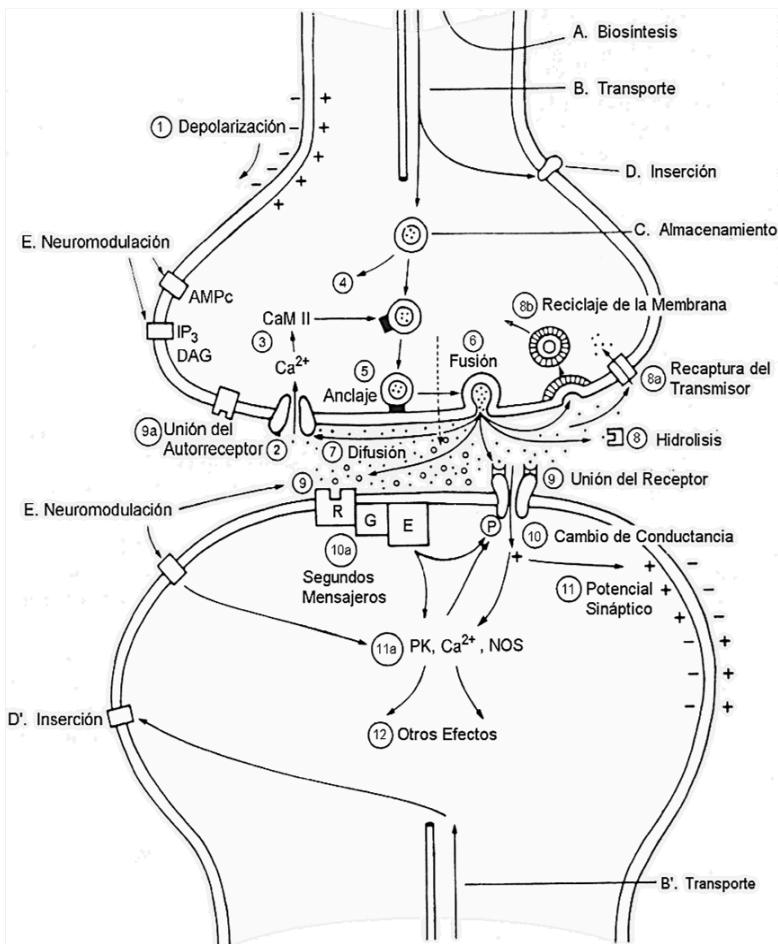


Figura 2. La transmisión sináptica. El proceso se esquematiza con base en su orden secuencial, del paso 1 al 11. Al llegar un potencial de acción a la terminal (1), se activan conductancias de Ca^{2+} (2) que permiten la entrada de este catión (3), involucrado en la preparación (4), anclaje (5) y fusión (6) de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. El neurotransmisor posteriormente se libera en la hendidura sináptica donde puede ser hidrolizado (8) o recapturado (8a) antes o después de unirse a algún receptor. La transmisión sináptica se efectúa cuando la molécula mensajera activa receptores acoplados a canales iónicos postsinápticos (9) cuyas corrientes iónicas generan potenciales eléctricos que se propagan por la membrana (10). De no ser el caso, es posible que el transmisor actúe como modulador activando receptores metabotrópicos que originan la modulación presináptica (9a), o postsináptica (10a); esta modulación no forma parte del proceso de transmisión estrictamente. Finalmente, si se activan los receptores necesarios para generar un cambio en el potencial de membrana, se generarán potenciales sinápticos que se propagan a lo largo de la membrana postsináptica (11). Existen otros procesos que se llevan a cabo a la par con la transmisión sináptica, como la síntesis y almacén del transmisor (A y C), y la regulación de vías de señalización que ejercen efectos diversos sobre la fisiología de la neurona (12). Modificado de Shepherd, 2004.

6. El neurotransmisor liberado ahora tiene 3 posibles destinos: ser recapturado por neuronas o por la glía; ser degradado por enzimas que se encuentren en el medio; o actuar como ligando específico a algún receptor que se encuentre en el elemento postsináptico.
7. Para que la transmisión sináptica se efectúe es necesaria esta unión del neurotransmisor con el receptor postsináptico; durante la activación de los receptores ionotrópicos, se induce un cambio conformacional que provoca la apertura del poro del canal. De esta manera, se generan corrientes iónicas y se da una respuesta postsináptica a manera de un potencial eléctrico que se propaga a través de la membrana. Dependiendo de a qué ion(es) sea selectivo el canal, se generarán potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) o inhibitorios.

Cada paso de la transmisión sináptica está determinado por una diversidad de factores. Por ejemplo, a nivel postsináptico se encuentran mecanismos encargados de aumentar o disminuir la sensibilidad con que se genera una respuesta a un estímulo dado. En cambio, a nivel presináptico encontramos otros mecanismos que determinan la cantidad de neurotransmisor liberado, los cuales se describen más adelante. En presinapsis, debido a la acción conjunta de estos mecanismos modulatorios, la cantidad de neurotransmisor liberado no es siempre la misma, por lo cual su liberación se considera un proceso probabilístico [Boyd y Martin, 1956; Miller, 1998; Hammond, 2008].

MODULACIÓN PRESINÁPTICA

La modulación presináptica es el conjunto de factores que regulan la cantidad de neurotransmisor liberado, pudiendo disminuir o aumentar la probabilidad de liberación. Aunque este proceso se realiza de distintas maneras, es originado por la activación de receptores metabotrópicos asociados a la membrana presináptica; la acción de estos receptores se ve mediada por segundos mensajeros que repercuten en el funcionamiento de los efectores finales de la modulación. Hasta el momento, se han reconocido tres efectores que pueden alterar la cantidad de transmisor liberado: (1) la maquinaria molecular que participa en la fusión de la vesícula sináptica; (2) canales de Ca^{2+} presinápticos; y (3) canales de K^+ presinápticos [Miller, 1998]. En los tres casos, es posible que se favorezca o se inhiba el funcionamiento normal de la maquinaria o de los canales iónicos, repercutiendo finalmente en la probabilidad de liberación. Con base a este mecanismo de la modulación, se puede decir que los canales iónicos presinápticos no participan en la liberación de una manera constante [Meir, 1999]. Debido a que la liberación es un proceso dependiente de calcio, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

(Ca_v) son considerados los principales responsables de la modulación [Zucker, 1993]; no obstante otros canales iónicos también participan indirectamente en la regulación de la liberación del transmisor. Dentro de estos, se encuentran los de K⁺ dependientes de voltaje, los rectificadores entrantes (K_{IR}) y en este trabajo se muestra el papel de los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺.

Canales de Ca²⁺ presinápticos

Independientemente de la modulación presináptica, los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Ca_v) en general son esenciales para la liberación del neurotransmisor [Zucker, 1993]. Se han identificado cinco subunidades diferentes que componen a esta familia de canales de Ca²⁺ (α₁, α_{2δ}, β, γ). La subunidad α₁ conforma tanto el poro del canal como el mecanismo sensible al voltaje encargado de su apertura; las subunidades α₁, α_{2δ}, β, γ modifican las propiedades fisiológicas de la subunidad principal. En base a sus características biofísicas, moleculares y farmacológicas, los canales Ca_v se han clasificado en dos principales grupos: (1) los canales de Ca²⁺ de bajo umbral, también llamados tipo T o Ca_v3, y (2) los canales de Ca²⁺ de alto umbral, que comprenden los canales tipo L o Ca_v1, tipo N o Ca_v2.2, tipo P/Q o Ca_v2.1 y tipo R o Ca_v2.3. En general, los canales de Ca_v están involucrados en los procesos intracelulares dependientes de Ca²⁺, ya que relacionan la señalización electrofisiológica a nivel de la membrana plasmática con estos procesos, dentro de los cuales podemos destacar la liberación del neurotransmisor [Catterall, *et al.*, 2005; Augustine, Santamarina y Tanaka, 2003].

En mamíferos y otros vertebrados se han encontrado los canales tipo L, N y P/Q en las terminales sinápticas del SN, pudiendo haber más de un tipo de canal en la misma terminal [Barral *et al.*, 1999; 2000; 2001; 2003; José *et al.*, 2007, Sanchez Mejorada *et al.*, 2009]; además de esto, la contribución de un tipo de canal de Ca²⁺ no es idéntica a la de contribución de otro [Mintz, Sabatini y Regehr, 1995; Meir *et al.*, 1999]. A las regiones membranales presinápticas donde se encuentren agrupados varios canales Ca_v, se les denomina dominios de Ca²⁺, debido a que en el citoplasma circundante ocurren variaciones relativamente grandes de la concentración de Ca²⁺ respecto a otras regiones del citoplasma; estas variaciones ejercen una influencia robusta sobre cualquier proceso dependiente de Ca²⁺ que se encuentre en la vecindad. La apertura de los canales Ca_v generalmente ocurre durante la llegada de un potencial acción, en donde se generan corrientes entrantes de Ca²⁺ que inducen un aumento en la [Ca²⁺]_i; desde una concentración basal de alrededor de 100 nM, hasta valores de entre 1 a 100 μM en la cercanía de los dominios de Ca²⁺; en el resto del citoplasma de la terminal también se da una alza en la [Ca²⁺]_i, aunque no es tan grande respecto a la del dominio debido a la difusión, la captura y el bombeo de este catión hacia reservorios intracelulares o hacia el exterior de la célula [Zucker,

1999; Neher y Sakaba, 2008]. Dentro de estos dominios de Ca^{2+} es probable encontrar sitios activos cuyas proteínas, que corresponden a la maquinaria de liberación del neurotransmisor, se encuentran asociadas con canales de Ca^{2+} para favorecer la liberación en función de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ocurren en estas regiones [Zucker, 1993; Lévêque *et al.*, 1994]. En cuanto al mecanismo por medio del cual se traducen las señales de Ca^{2+} a una liberación del transmisor, se ha propuesto a una familia de proteínas, denominadas sinaptotagmina, como los principales sensores del Ca^{2+} intracelular y como efectoras sobre los complejos proteicos que realizan la fusión de la vesícula sináptica con la membrana plasmática [Littleton *et al.*, 2001; Hammond, 2008].

Canales de K^+ presinápticos

Un grupo de canales iónicos cuya contribución a la excitabilidad es muy importante son los canales de K^+ . En las últimas décadas se ha sugerido y evidenciado el papel de los canales de K^+ como participantes en la modulación presináptica [Meier, 1999; Kim y Hoffman, 2008; Rama, Zbili y Debanne, 2014].

De todas las familias de canales iónicos, los canales de K^+ son el grupo más diverso, y tal vez también de los más estudiados. Se han reconocido tres principales grupos con base a la estructura primaria de las subunidades α que les confiere diferentes dinámicas y funciones en la membrana. El primer grupo contiene a la familia de canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v), y los dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}). Los canales K_v son responsables de la generación de la corriente A (I_A) que provoca el retraso en la aparición de un potencial de acción, y de la repolarización; los canales K_{Ca} contribuyen a la repolarización y generan el postpotencial hiperpolarizante (PPH) y la adaptación en la frecuencia de disparo. El segundo grupo corresponde a la familia de rectificadores entrantes (K_{IR}); estos canales contribuyen al mantenimiento del potencial de reposo. Finalmente, el tercer grupo contiene a la familia de canales más recientemente descubierta, los canales de K^+ de doble poro involucrados en las llamadas corrientes de fuga [Coetzee *et al.*, 1999; Hille, 1992].

Ahora bien, las funciones de los canales de K^+ en las neuronas se han estudiado al nivel del soma, por lo que su función en otras regiones de la membrana se ha inferido en base a éstas [Meir *et al.*, 1999]. Además, cada familia de canales de K^+ contribuye de manera especial a la excitabilidad membranal, de tal modo que su presencia en diferentes proporciones y regiones de la membrana determina las propiedades activas de una neurona. Por lo tanto, los canales de K^+ serían los responsables del mantenimiento del potencial de reposo, la repolarización, el PPH, la

facilidad con la que se evoque un potencial de acción, la regulación de la frecuencia de disparo y la duración de los eventos de disparos en ráfaga, todo esto en la membrana presináptica; estos aspectos funcionales se verían reflejados en la cantidad de Ca^{2+} entrante durante cada potencial de acción, que finalmente repercute la probabilidad de liberación del transmisor.

Prácticamente todos los grupos de canales de K^+ mencionados anteriormente se han identificado a nivel presináptico en distintas sinapsis del SN de mamíferos [Meneses et al., 2015; 2016]. Una de las familias de canales de K^+ que se ha propuesto como un participante probable y estratégico en la liberación del neurotransmisor es la familia de canales K_{Ca} [Bartschat y Blaustein, 1985; Robitaille y Charlton, 1992; Kim y Hoffman, 2008].

CANALES DE K^+ DEPENDIENTES DE Ca^{2+}

Los canales K_{Ca} son la segunda familia más numerosa de canales de K^+ después de los dependientes de voltaje. Su funcionamiento, al estar favorecido con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, les confiere una dependencia directa con las conductancias de Ca^{2+} dependientes de voltaje; sin embargo, los canales K_{Ca} a su vez establecen una relación indirecta de retroalimentación negativa sobre la actividad de los canales Ca_v a través de la hiperpolarización del potencial de membrana. Debido a esta relación fisiológica, la actividad de los canales K_{Ca} repercute sobre funciones que dependen de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, como la contracción muscular, la secreción hormonal y la liberación del neurotransmisor en las terminales sinápticas del SN [Vergara *et al.*, 1998]. Tomando en cuenta su estructura primaria, se pueden discernir cinco grupos principales: $\text{K}_{\text{Ca}1}$ (canales BK), $\text{K}_{\text{Ca}2}$ (canales SK), $\text{K}_{\text{Ca}3}$ (canales IK), $\text{K}_{\text{Ca}4}$ y $\text{K}_{\text{Ca}5}$ [Wei *et al.*, 2005]. Este trabajo sólo se enfocó en los dos primeros grupos, los BK y los SK, ya que los canales IK al parecer no se expresan en el SNC de mamíferos, mientras que las subfamilias $\text{K}_{\text{Ca}4}$ y 5 no son sensibles al Ca^{2+} .

Canales $\text{K}_{\text{Ca}1}$ o BK

Los canales BK fueron la primera subfamilia de canales K_{Ca} en ser caracterizada tanto por su dependencia tanto al Ca^{2+} intracelular como al voltaje, y su conductancia unitaria grande respecto al resto de los canales de K^+ ; los canales BK se han encontrado en prácticamente todos los tipos de células excitables [Hille, 1992].

Los canales BK están compuestos por cuatro subunidades α , de siete segmentos transmembranales cada una, que juntas conforman el poro; también presentan una subunidad β de dos segmentos transmembranales que se mantiene asociada a la subunidad principal con una

estequiometría 1:1 (Figura 3). Los segmentos S5-S6 forman el poro del canal, mientras que la dependencia de los canales BK al voltaje se debe a los segmentos S2-4, y su dependencia al Ca^{2+} se relaciona con tres sitios de unión en la región carboxilo terminal de la subunidad α ; dos de los tres sitios de unión al Ca^{2+} se les denomina sitios de regulación de conductancia de K^+ , o RCK, mientras que el tercero convencionalmente se le llama “canasta de Ca^{2+} ”. La subunidad β tiene funciones de regulación en la dinámica de activación y desactivación del canal, y modifica su sensibilidad farmacológica a algunos bloqueadores [Berkefeld *et al.*, 2010]. La estructura molecular de los canales BK ha ayudado a los investigadores a entender su funcionamiento. No obstante, debido a su sensibilidad tanto al voltaje como al Ca^{2+} , su dinámica de funcionamiento es más compleja que la de los canales K_v , debido a que estos dos factores cooperan sinérgicamente para la activación del canal. Un aspecto muy importante de la biofísica de estos canales es que presentan la conductancia unitaria más grande conocida dentro de los canales de K^+ , con valores de alrededor de 250 pS [Pantazis y Olcese, 2016]. Esta magnitud puede explicar su contribución significativa en la excitabilidad membranal.

Dentro de las funciones de los canales BK destacan: (1) una contribución importante a la repolarización, lo que determina la duración del potencial de acción; y (2) la generación del post-potencial hiperpolarizante rápido (PPHr) [Storm, 1997], que repercute a la regulación de la frecuencia de disparo. Su actividad se ve inhibida por el tetraetilamonio (TEA) a concentraciones menores a 1 mM, por Ba^{2+} a concentraciones micromolares y por Cs^+ a concentraciones milimolares [Coetzee *et al.*, 1999]. La caribdotoxina (CTX; $\text{IC}_{50} = 2.9 \text{ nM}$) y la iberiotoxina (IbTX; $\text{IC}_{50} = 250 \text{ pM}$), dos toxinas proteínicas que se extraen del veneno de alacranes, también inhiben el funcionamiento de los canales BK. En cuanto a sus agonistas, se ha encontrado que los alcoholes, como el etanol, incrementan la probabilidad de apertura de estos canales [Galvez *et al.*, 1990; Wei *et al.*, 2005; Martin, 2010].

Su distribución dentro del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos es muy amplia; las regiones donde hay mayor expresión de la subunidad α son el bulbo olfatorio, corteza, ganglios basales (GB), hipocampo, tálamo, núcleos vestibulares y la espina dorsal [Contet *et al.*, 2016].

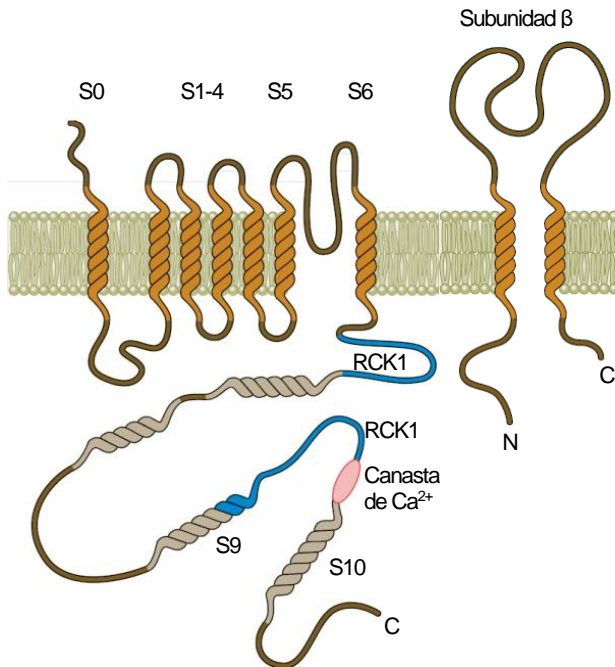


Figura 3. Estructura molecular de los canales BK. Los canales BK están constituidos por cuatro subunidades α y una β . Aquí se esquematiza la estructura de estas proteínas asociadas a la membrana plasmática. La subunidad α se compone de siete segmentos transmembranales (S0-S6); los segmentos S8-10 se encuentran en el citosol. El segmento sensible al voltaje es S4, mientras que S5 y S6 conforman el poro del canal; RCK1 y 2, así como la canasta de Ca^{2+} son sitios de unión al Ca^{2+} que le confieren al canal la sensibilidad a este catión. La subunidad β se compone de dos segmentos transmembranales unidos por un asa extracelular. Modificado de Berkefeld *et al.* 2010.

Canales $\text{K}_{\text{Ca}2}$ o SK

Además de los canales BK, otro grupo muy conocido de canales K_{Ca} son los canales SK, originalmente identificados como canales de “conductancia pequeña”, insensibles al voltaje y que sólo se activan a concentraciones nanomolares de Ca^{2+} intracelular ($K_d = 600-700 \text{ nM}$). Hasta el momento se han identificado tres subunidades diferentes: SK1 o $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, SK2 o $\text{K}_{\text{Ca}2.2}$ y SK3 o $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$. Algunos autores incluyen a los canales IK ($\text{K}_{\text{Ca}3.1}$) dentro de los SK como una subfamilia más (en este caso, $\text{K}_{\text{Ca}2.4}$) por la similitud existente entre las estructuras primarias de sus subunidades α . En general, la estructura molecular de los canales SK (Figura 4) comprende cuatro subunidades de seis dominios transmembranales cada una, cuyos segmentos 5 y 6 componen el poro del canal. La dependencia al Ca^{2+} de los canales SK no se debe estrictamente a alguna propiedad especial de la subunidad principal, sino que se deriva de su acción conjunta con otra proteína, la calmodulina (CaM); esta es una proteína citoplasmática involucrada en la captura y regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En el carboxilo terminal de la subunidad α se encuentra el llamado sitio de unión a la calmodulina o CaMBD. La CaM, al estar estructuralmente asociada al canal, promueve la apertura del poro; debido a esta función, a la CaM se le considera como una

subunidad accesoria o “β” asociada a la subunidad principal de los canales SK [Schumacher, Rivard, Bächinger y Adelman, 2001].

Aunque el Ca^{2+} se une a la CaM a concentraciones micromolares, cuando ésta se encuentra asociada a la CaMBD, su sensibilidad al catión aumenta hasta concentraciones nanomolares. De esta manera, la probabilidad de apertura de los canales SK se incrementa con variaciones relativamente pequeñas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que ha llevado a considerarlos como importantes reguladores del Ca^{2+} intracelular en condiciones basales; no obstante las funciones que más representan a estos canales en la excitabilidad membranal son la generación del PPH mediano (PPHm), la adaptación de la frecuencia de disparo y la latencia posterior a eventos de disparos en ráfaga [Stocker, Krause y Pedarzani, 1999; Stocker, 2004].

Su funcionamiento se ve afectado por agonistas y antagonistas exógenos cuyos efectos se han aprovechado para estudiar la contribución de los canales SK a la fisiología celular. Los canales SK son bloqueados por la apamina, un componente del veneno de abeja que inhibe su apertura a diferentes concentraciones dependiendo de la subunidad α de la que se trate: $\text{IC}_{50} = 3.3 \text{ nM}$ para la subunidad SK1, 83 pM para SK2 y 0.6 nM para SK3 [Barfod, Moore y Lidofsky, 2001; Strøbæk, *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2005]. La bicuculina, un alcaloide muy utilizado para bloquear receptores GABA_A , también ejerce un efecto inhibitorio sobre los canales SK ($\text{IC}_{50} = 1.1 \text{ }\mu\text{M}$) [Khawaled, Bruening-Wright, Adelman y Maylie, 1999].

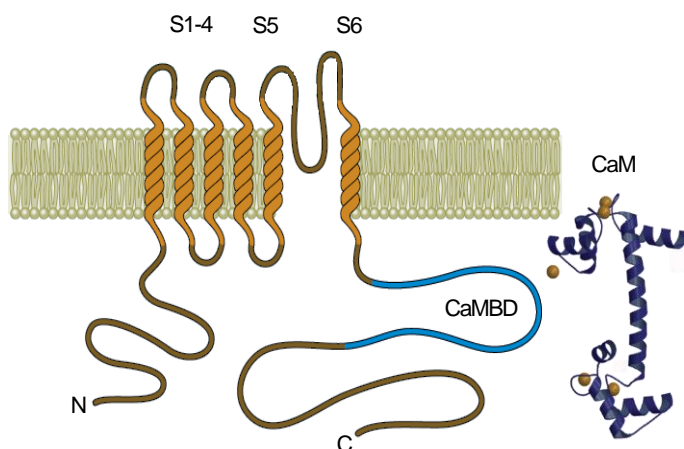


Figura 4. Estructura molecular de los canales SK. La estructura general de la subunidad α se esquematiza con su respectiva asociación en la membrana plasmática. Los segmentos transmembranales de la subunidad (café claro) se enumeran desde el amino inicial hasta el carboxilo terminal (café oscuro). El sitio de unión a la calmodulina (CaMBD) se puede observar justo en la cadena del carboxilo terminal (azul), la cual mantiene la unión con una CaM. Esta proteína representa a una subunidad complementaria, también llamada β . La CaM establece una relación estructural y funcional con la subunidad α debido a su sensibilidad a la concentración de Ca^{2+} intracelular; cuando esta se une al calcio libre, induce la apertura del canal. Modificado de Berkefeld *et al.*, 2010; modelo de CaM tomado de Wilson y Brunger, 2000.

Las tres subunidades principales de los canales SK se encuentran ampliamente distribuidas en el SNC. Las subunidades SK1 y 2 mantienen un patrón de expresión similar, en donde la capa V de corteza y el hipocampo son las estructuras que tienen más nivel de expresión de estas subunidades. En cuanto a la subunidad SK3, su distribución es muy contrastante

respecto a sus homólogas; el tálamo, el núcleo dorsal del *rafe*, la *substantia nigra* y el cerebelo son algunos de los núcleos que presentan mayor expresión de esta subunidad [Stocker y Pedarzani, 2000].

Importancia de los canales K_{Ca} presinápticos

A los canales K_{Ca} se les ha considerado mecanismos probables y efectivos de retroalimentación negativa: en cualquier condición que involucre un alza en la $[Ca^{2+}]_i$, habría una respuesta hiperpolarizante que disminuiría la facilidad con que se excite la membrana y se activen conductancias de Ca^{2+} [Reinhart, Chung y Levitan, 1989; Tonini *et al.*, 2013; Benhassine y Berger, 2008]. Se ha observado que el significado de su funcionamiento sobre las propiedades activas de la membrana depende de la región de la célula donde se encuentre, por ejemplo, en el soma o en la terminal sináptica [Hu *et al.*, 2001; Sah, 1996]. En base con estos aspectos funcionales, en presinapsis los canales K_{Ca} contribuirían significativamente a la regulación del proceso calcio-dependiente de la liberación mediante una relación funcional establecida con los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. Esta relación es congruente con evidencia reciente acerca de asociaciones estructurales existentes entre los canales de Ca^{2+} tipo N y los canales BK, lo que sugiere un arreglo espacial estratégico para esta familia de canales [Berkefeld *et al.*, 2006]. Con base en este acoplamiento espacial y funcional de canales K_{Ca} , en condiciones de sobreexcitación que desencadenen una elevada concentración del Ca^{2+} intracelular, estos canales podrían servir como un “freno de emergencia” para este tipo de eventos, adquiriendo una importancia protectora para la fisiología normal en la presinapsis y en la neurona en general [Hu *et al.*, 2001].

Los canales K_{Ca} se han estudiado en prácticamente todas las sinapsis más conocidas del SNC de mamíferos. A nivel de modulación sináptica, quizás una de las sinapsis más estudiadas es la sinapsis corticoestriatal, que se encuentra en el conjunto de núcleos denominados ganglios basales.

GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son un conjunto altamente interconectado de núcleos subcorticales. Están integrados por cuatro núcleos principales: el cuerpo estriado; el globo pálido (GP), subdividido en a su vez en el *globo pálido* externo e interno (GPe y GPi, respectivamente); el núcleo subtalámico (NST), también llamado subtálamo; y la sustancia *nigra* (SN), la cual se compone por dos partes, la *pars compacta* y la *pars reticulata* (SNc y SNr respectivamente). Los GB han sido estudiados por estar asociados a funciones motoras; su importancia radica en estar

involucrados en la planeación, la iniciación y el control del movimiento, así como la conducta y el aprendizaje motor, debido a que interconectan la corteza cerebral con algunos núcleos asociados al comportamiento [Gerfen y Bolam, 2010], además de que un mal funcionamiento derivado por uno o más de estos núcleos puede llegar a comprometer la iniciación y el control del movimiento voluntario [Wichmann y DeLong, 2000].

Circuito básico de los GB

Hay tres aspectos que se pueden distinguir y destacar del circuito general de los GB: (1) las entradas o aferencias de información desde otras regiones del encéfalo hacia los núcleos de entrada; (2) las salidas o vías eferentes de axones provenientes de las neuronas de proyección del o de los núcleos de salida; y (3) la misma conectividad interna entre los núcleos de los GB que procesa la información entrante para generar alguna posible respuesta dirigida a los núcleos de salida. Estas conexiones, y el arreglo de los núcleos en el SNC del roedor se pueden apreciar en la Figura 5.

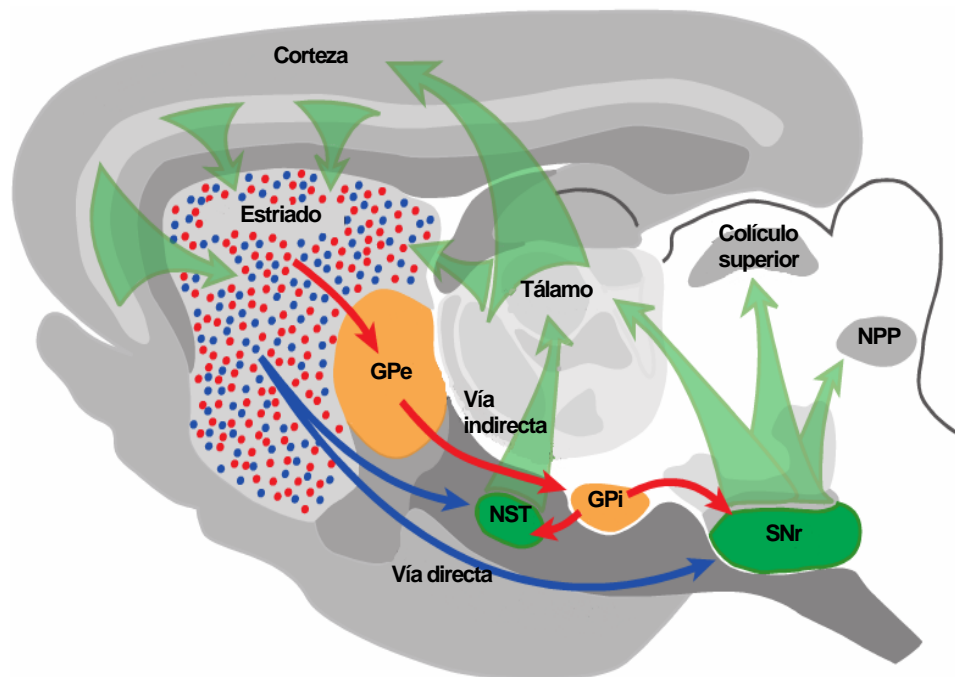


Figura 5. Arreglo y conectividad de los ganglios basales. Aquí se aprecia un esquema del cerebro de rata donde se destaca el circuito básico de los GB. Las vías de entrada y salida de los GB se ilustran con flechas verdes, mientras que las conexiones que se establecen entre los núcleos dentro de los GB se muestran de color azul para la vía directa, y rojo para la vía indirecta. Se destacan las dos vías de información que son discernibles desde el estriado: la vía directa que se origina por las neuronas espinosas medianas (NEMs) que expresan el receptor a dopamina D1 y cuyo objetivo es la SNr, y la vía indirecta que proviene de las NEMs expresando el receptor D2 y que proyectan hacia el GPe. Modificado de Gerfen, 2006.

En cuanto a la entrada de información, los GB reciben aferencias principalmente desde la corteza, así como de otros núcleos como: el núcleo parafascicular talámico (NPF), del núcleo túbromamilar, del núcleo dorsal del *rafe*, de la amígdala y del hipocampo. Todas estas entradas convergen en el núcleo principal de entrada al resto de los GB, el estriado. No obstante, existen colaterales provenientes del exterior de los GB que también pueden hacer sinapsis en el resto de los núcleos de los GB, como algunas terminales corticales que se encuentran en el NST. [Bolam y Ellender, 2016; Gerfen y Bolam, 2010; Wilson, 2004].

Los núcleos de salida de los GB son el GPi y la SNr. Las vías eferentes que provienen del GPi proyectan hacia el núcleo ventral lateral (NVL) y el NPF del tálamo. Al mismo tiempo, la SNr proyecta sus axones hacia el NPF, el núcleo ventral medial y el núcleo medial dorsal del tálamo, la corteza frontal, el colículo superior y el núcleo pedúnculo pontino [Wilson, 2004]. Todos estos núcleos de salida tienen funciones motoras y conductuales; además, las terminales GABAérgicas de la SNr hacia el NPF regulan la actividad de las regiones corticales frontales que se han asociado a la misma planeación del movimiento, por medio de vía tálamo-cortical [Gerfen y Bolam, 2010].

De esta forma, la información de origen cortical repercute en la actividad de núcleos del diencefalo y el mesencefalo involucrados en el comportamiento motor, cuando previamente ha sido procesada dentro del circuito de los GB. Cuando se describe este circuito, se pueden discernir dos vías que se encargan de procesar y comunicar la información que proviene del núcleo de entrada (el estriado) con los núcleos de salida (GPi y SNr). Estas dos vías se han separado por el arreglo sináptico que comprenden entre los núcleos y por la significancia funcional y conductual que representan, aunque ambas son originadas en el estriado (ver Figura 1-B).

La vía directa comprende un haz de axones que conectan directamente el estriado con el GPi y la SNc, por lo que también se le suele denominar vía estriatonigral. En esta vía se da una disminución en la liberación de GABA sobre los núcleos exteriores, que finalmente se traduce en un aumento en la actividad talámica y cortical y un favorecimiento del movimiento. Contrariamente, la vía indirecta, también llamada vía estriatopalidal, pone de por medio al GPe y el NST como relevos entre el estriado y el GPi-SNr. Debido a este arreglo que pone de por medio a las neuronas GABAérgicas del GPe, existe una inhibición de los núcleos blanco fuera de los GB; por lo tanto, el efecto final es una inhibición del movimiento [Gerfen y Bolam, 2010].

Debido a que es el origen de la vía directa e indirecta y a la significancia que ejerce sobre la activación o inactivación de estas dos vías por parte de la entrada de información cortical y talámica principalmente, el estriado se ha considerado el núcleo de mayor importancia para el control del movimiento.

El estriado

El estriado recibe su nombre por la gran densidad de axones que recibe y que dan la apariencia de estrías que atraviesan el núcleo desde la región dorsal hasta la ventral. Su importancia recae en ser el principal núcleo de entrada al resto de los núcleos de los ganglios basales. Está compuesto por el núcleo caudado, el putamen y el núcleo *accumbens*. En primates tanto el caudado como el putamen permanecen separados por la cápsula interna, mientras que en roedores se encuentran adyacentes. De aquí en adelante se referirá al estriado como el conjunto de los tres núcleos debido a que permanecen adyacentes en el SNC de la rata, sin embargo, el presente trabajo se enfoca en los dos primeros (el caudado y putamen) [Groenewegen y Uyling, 2010].

Dentro de este núcleo hay diferentes tipos de neuronas que se han caracterizado morfológica, bioquímica y electrofisiológicamente. Las neuronas que reciben la mayor cantidad de entradas de los núcleos exteriores son las neuronas espinosas medianas (NEMs), también llamadas neuronas espinosas de proyección debido a que del mismo modo son las neuronas que conforman las vías de salida hacia el GPe o GPi-SNr. Estas neuronas representan un 95% de la población neuronal de estriado. Las NEMs reciben su nombre por su morfología. Su soma mide 12–20 μm , presentan de 7 a 10 dendritas primarias que se ramifican formando dendritas secundarias; a partir de éstas se observa una gran densidad de espinas dendríticas; el espacio que ocupa el árbol dendrítico de una NEM es de alrededor de 200 μm de diámetro. Su axón es proyectado fuera del núcleo, aunque también se ramifica para dar lugar a algunos axones colaterales que hacen sinapsis con otras NEMs e interneuronas que se encuentren en la vecindad [Plenz y Wickens, 2010].

Las características electrofisiológicas de las NEMs han sido bien descritas en las últimas décadas. Presentan un potencial de reposo de -70 a -80 mV, aunque es posible la oscilación entre dos potenciales de reposo en condiciones *in vivo*, denominados estados *up* y *down* [Wilson y Kawaguchi, 1996; Vergara *et al.*, 2003]. Las NEMs tienen dos corrientes rectificadoras de K^+ , una que se activa a potenciales hiperpolarizados generada por canales K_{ir} que se opone a la hiperpolarización, y otra corriente “A” (I_A) originada por los canales K_{v} que retrasa el disparo del

potencial de acción a estímulos despolarizantes [Nisenbaum y Wilson, 1995; Gabel y Nisenbaum, 1998]. Además, presentan un PHP debido a la activación de conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}) [Pineda *et al.*, 1992; Pérez-Garci, Bargas y Galarraga, 2003]. Durante el disparo en ráfagas, es posible observar una adaptación en la frecuencia de disparo que también se le atribuye a la actividad de estas conductancias de potasio.

Las NEMs presentan un diseño morfológico especial que les permite integrar una cantidad considerable de información proveniente de múltiples fuentes. Estas neuronas reciben proyecciones glutamatérgicas de las capas V y III de la corteza, del tálamo, de la amígdala y del hipocampo, así como aferencias serotoninérgicas del núcleo dorsal del *rafe* y dopaminérgicas provenientes de la SNc. Las NEMs también reciben entradas de colaterales inhibitorias de sus homólogas [Groenewegen y Uyling, 2010].

Las NEMs están bajo la modulación constante por la actividad colinérgica y GABAérgica de interneuronas que forman parte del microcircuito estriatal: (1) las interneuronas colinérgicas, también llamadas neuronas grandes sin espinas, inervan a las NEMs en el soma, los ejes dendríticos y en las espinas dendríticas; (2) las interneuronas parvalbuminérgicas (que junto con las somatostatinérgicas, conforman el grupo de interneuronas GABAérgicas del estriado, también llamadas neuronas medianas sin espinas) que hacen sinapsis con las NEMs principalmente a nivel del soma; (3) las interneuronas somatostatinérgicas; sus terminales realizan sinapsis en las espinas y ejes dendríticos de las NEMs [Kawaguchi *et al.*, 1995].

Ahora bien, referente a la salida de información hacia otros núcleos de los GB, las NEMs se subdividen en dos poblaciones; una de ellas colibera substancia-P además de GABA, y de acuerdo al circuito sináptico que presentan, forman la vía directa. La otra mitad de las NEMs, además de GABA colibera encefalinas y forma la vía indirecta. Por otro lado, estas neuronas presentan receptores dopaminérgicos: las neuronas que tienen substancia-P presentan receptores dopaminérgicos de la familia D1, mientras que las NEMs encefalinérgicas presentan receptores D2 [Kawaguchi, 1997]

Debido a que las NEMs juegan un papel fundamental en el flujo de la información a través de ambas vías, se han estudiado los procesos de transmisión sináptica y sus respectivos mecanismos moduladores tanto a nivel presináptico, como postsináptico en las diferentes entradas que convergen en estas neuronas. La sinapsis corticoestriatal junto con la tálamoestriatal, acarrearán la mayor cantidad de información entrante a los GB.

Sinapsis corticoestriatal

En las capas V y III de la corteza podemos encontrar dos tipos de neuronas piramidales, aquellas que contribuyan con sus axones al tracto piramidal en el tallo encefálico, y aquellas que sólo proyecten hacia la misma corteza en ambos hemisferios. A las primeras se les denomina neuronas del tracto piramidal (TP), mientras que a las últimas se les conoce como neuronas intratelencefálicas (IT) [Reiner, 2010].

En a sinapsis corticoestriatal, ambas neuronas inervan el estriado haciendo sinapsis principalmente con las NEMs; existen varios aspectos generales que hay que considerar para entender el funcionamiento de esta sinapsis. Asumiendo que todas las áreas corticales proyectan hacia el estriado, también existe una lógica topográfica al momento de integrar la información cortical; por ejemplo, el caudado recibe mayor cantidad de aferencias de la corteza prefrontal,

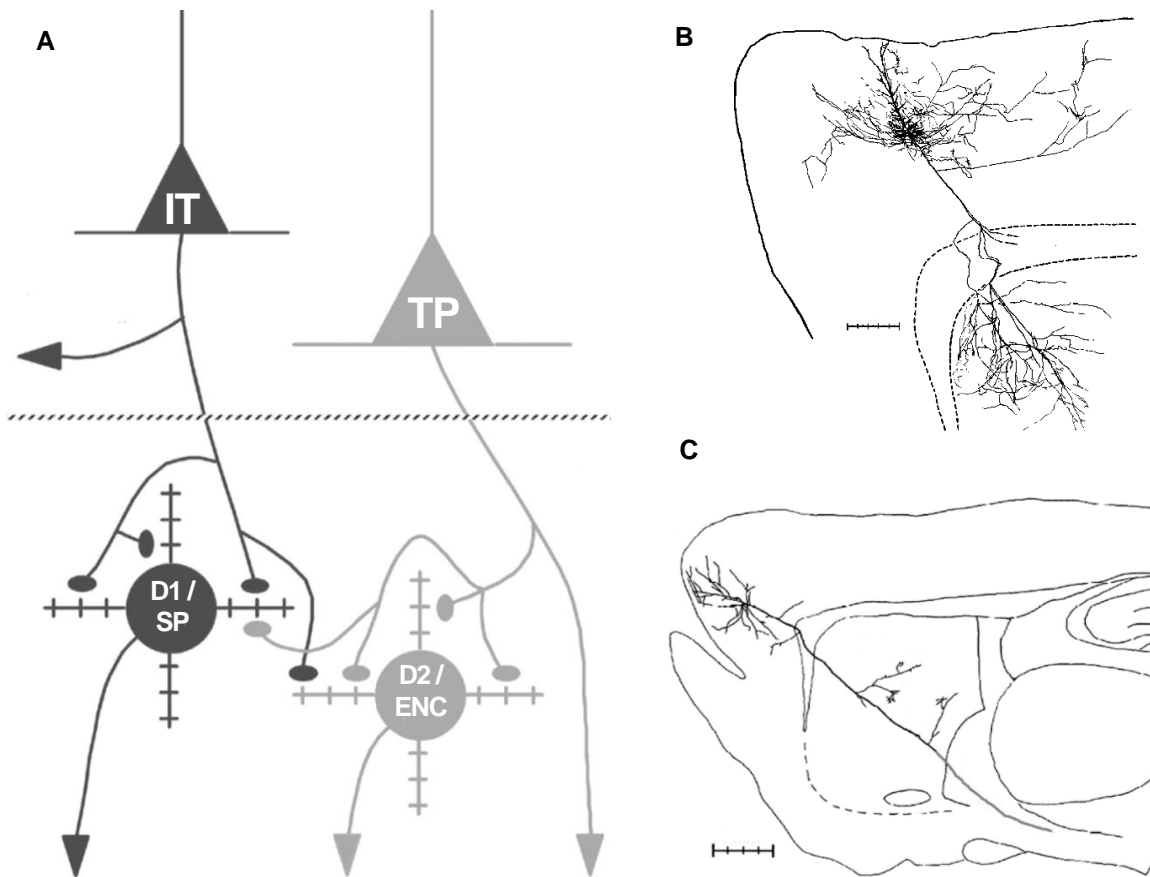


Figura 6. Representación de la sinapsis corticoestriatal de la rata. En A se esquematizan los dos tipos de neuronas corticales que proyectan hacia el estriado: las intratelencefálicas (IT) y las del tracto piramidal (TP), las cuales hacen sinapsis con los dos tipos de células de proyección del estriado: NEMs de la vía directa que expresan el receptor D1, y neuronas de la vía indirecta que expresan D2 de manera preferencial, respectivamente. En B y C se muestra la arborización de una neurona TP y una IT, respectivamente; escala: 1 mm. Tomada de Reiner, 2010.

mientras que el putamen integra información proveniente de corteza motora y sensitiva. Además, se ha observado cierta preferencia en cuanto a la cantidad de sinapsis conformadas dependiendo de la NEM que se trate; las neuronas del TP tienden a formar mayor cantidad de sitios activos con las NEMs que conforman la vía indirecta en los GB, mientras que las neuronas IT mantienen una preferencia sobre las que originan la vía directa (Figura 6). Tomando en cuenta este patrón de inervación de los axones corticoestriatales, se ha inferido que ninguna NEM presenta semejanza con alguna homóloga respecto a sus las entradas corticales [Groenewegen y Uyling, 2010].

A un nivel más fino, las sinapsis que forman las terminales corticales son asimétricas glutamatérgicas; se han encontrado los receptores a glutamato NMDA y AMPA-kainato en las densidades postsinápticas de las NEMs, aunque también están presentes los receptores mGluR1. Debido a la presencia de diversos receptores a nivel pre- y postsináptico se ha incentivado el estudio de la modulación en la transmisión sináptica mediada por estos receptores mediante protocolos de depresión, potenciación y facilitación. Debido a que los canales iónicos están involucrados en la modulación presináptica, se ha querido conocer tanto su presencia como su papel en la transmisión.

ANTECEDENTES

Como se mencionó, en las sinapsis químicas la liberación del transmisor depende de la entrada de Ca^{2+} a la terminal durante la llegada de un potencial de acción [Zucker, 1993], y es modulada por canales de K^+ [Roeper y Pongs, 1996; Kim y Hoffman, 2008], aunque la modulación presináptica también puede ser mediada por canales de Ca^{2+} [Miller, 1998]. Dentro de los canales de K^+ que participan en la liberación, se han considerado los canales K_{Ca} desde que se confirmó su actividad en terminales nerviosas de fotorreceptores [Edgington y Stuart, 1981; Stockbridge y Ross, 1984]. Mediante métodos bioquímicos, se ha confirmado su papel inhibitorio en terminales sinápticas provenientes de la corteza [Martire *et al.*, 2010]. En los GB, los BK se han encontrado en neuronas del GP [Song, Su, Chen y Ji, 2010]; dentro del estriado, se han identificado en interneuronas y en las NEMs [Goldberg y Wilson, 2005; Bargas *et al.*, 1998; Galarraga *et al.*, 2007].

En la sinapsis corticoestriatal de la rata se ha evidenciado la presencia y la importancia funcional a nivel presináptico tanto de canales de Ca^{2+} [Barral *et al.*, 1999, 2000, 2001; Lovinger, Merritt y Reyes, 1994] como de K^+ . De estos últimos, en el laboratorio se ha logrado describir la

contribución de dos grupos principales de canales de K^+ , los cuales son los operados por voltaje (K_v1 , K_v3) y los rectificadores entrantes (K_{IR3}) [Jose *et al.*, 2007; Meneses *et al.*, 2015; Meneses, *et al.*, 2016]. Sin embargo, no hay evidencia de que los canales K_{Ca} participen en la liberación de glutamato en esta sinapsis, por lo cual el presente trabajo aborda este problema con una aproximación fisiológica. En algunas sinapsis del hipocampo se ha utilizado el protocolo de FPP para determinar la presencia funcional de los canales BK [Hu *et al.*, 2001; Raffaelli *et al.*, 2004; Martire *et al.*, 2010].

JUSTIFICACIÓN

La transmisión sináptica es un proceso altamente orquestado y regulado por mecanismos bioquímicos y electrofisiológicos. Esta regulación es necesaria debido a que la información transmitida de una célula a otra conlleva ciertos aspectos importantes: (1) la considerable cantidad de energía requerida para la síntesis, almacenamiento y liberación del neurotransmisor, los procesos concernientes a la modulación, así como el mantenimiento del balance de iones en la membrana por su transporte activo; (2) la correcta cantidad de neurotransmisor que debe ser liberado en cada evento discreto contribuye a la eficacia de transmisión de la información; (3) la modulación o plasticidad sináptica es imprescindible en procesos de aprendizaje y/o memoria a nivel celular; (4) el funcionamiento anormal de uno solo de los elementos necesarios en la sinapsis puede significar una condición patológica.

Debido a la complejidad, así como la diversidad existente en las sinapsis en el SN, es necesario identificar los elementos y factores que componen a cada una de ellas para poder abordar y entender los posibles correlatos fisiológicos de procesos como la memoria en condiciones normales y patológicas. Uno de estos elementos son los canales iónicos.

Los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} contribuyen a la excitabilidad normal de las neuronas y son un factor importante en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$, así como de los procesos intracelulares metabólicos que dependen de la homeostasis de este catión, como la liberación del neurotransmisor. Dado que las altas frecuencias de disparo son una de las causas de cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} que pueden conducir a una falla en la actividad eléctrica y sináptica de la célula, se les ha atribuido un papel de protección a manera de “freno de emergencia” en la excitabilidad celular. Debido a esta posibilidad, se han tomado como posibles blancos terapéuticos en contra de isquemias y epilepsia [Berkefeld, Fakler y Schulte, 2010; Hu *et al.*, 2001]. Se han desarrollado tratamientos contra isquemia cerebral basados en la apertura de canales BK mediada por fármacos, con resultados positivos [Gribkoff *et al.*, 2001]. Cabe

mencionar que su sensibilidad a los alcoholes, como el etanol, da lugar a explicaciones de los efectos de estas sustancias sobre la fisiología cerebral y la conducta misma.

Estas implicaciones han incentivado investigación en cuanto a su localización y significancia en las sinapsis. Hasta el momento, los estudios se han enfocado en las sinapsis más estudiadas, como el Calix de Held [Knaus *et al.*, 1996].

Por otro lado, a los GB se les han asociado enfermedades propias del sistema motor y otras relacionadas con la motivación y las adicciones. Se ha discutido sobre la necesidad de una correcta integración sináptica por parte de las NEMs; por ejemplo, los efectos de algunas patologías que afectan el funcionamiento de los GB son causadas por fallas en la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores en el estriado; sin embargo, sus funciones no se han entendido con totalidad [Gerfen y Bolam, 2010]. Es necesario identificar las partes que componen a la sinapsis corticoestriatal, como los canales iónicos presinápticos, si se quiere entender cómo se lleva a cabo la transmisión y la modulación sináptica en condiciones normales y patológicas [Miller, 1998; Ashcroft, 2000].

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia funcional de los canales K_{Ca} a nivel presináptico y postsináptico en la sinapsis corticoestriatal de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar farmacológicamente los canales K_{Ca} que participan en la liberación en las terminales sinápticas corticales que hacen sinapsis con las NEMs.
2. Analizar la posible contribución que realizan los canales K_{Ca} en la liberación de glutamato.
3. Confirmar la importancia de los canales K_{Ca} a nivel postsináptico.

HIPÓTESIS

La modulación presináptica está mediada por los canales de K^+ presinápticos. Una de sus familias, los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , podría encontrarse a nivel presináptico, por lo que su participación en la liberación del neurotransmisor podría determinarse en una gran cantidad de sinapsis en el SNC de mamíferos. Los canales K_{Ca} de estar presentes en las terminales glutamatérgicas de corteza que establecen sinapsis con las NEMs del estriado de la rata, entonces durante su bloqueo específico se observaría una reducción en la facilitación por

pulsos pareados (FPP) del registro electrofisiológico de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) de la neurona postsináptica, dado que el bloqueo inespecífico de otras conductancias de K^+ provoca esta disminución en la FPP.

MATERIAL Y MÉTODOS

ORGANISMOS

Se utilizaron ratas Wistar de 14–16 días de edad de sexo masculino, mismas que se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (28 mg/kg). Se realizó una perfusión intracardiaca donde se inyectó una solución de glucosa-sacarosa (en mM: 2.49 KCl; 28 NaHCO₃; 1.43 NaH₂PO₄; 7 glucosa; 23 sacarosa; 0.1 MgCl₂; 0.1 CaCl₂ y 3.6 piruvato sódico). Posteriormente el cerebro fue removido y puesto en una cámara de disección con solución fisiológica Krebs (en mM: 125 NaCl; 3 KCl; 2 MgCl₂; 2 CaCl₂; 25 NaHCO₃; y 10 glucosa; pH 7.4) a una temperatura aproximada de 2 °C. En estas condiciones, se obtuvieron rebanadas parasagitales de 250 μ m de espesor con ayuda de un vibratomo (Easislicer, Ted Pella Inc., Redding, California, USA), para después ser incubadas durante 1 h en una cámara con la misma solución fisiológica a temperatura ambiente. Todas las soluciones utilizadas en la disección se mantuvieron bajo constante aireación con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂.

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

Las rebanadas se transfirieron a una cámara de registro que se encontraba en perfusión constante con solución salina Krebs, la cual tenía aireación constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Se realizaron registros electrofisiológicos en fijación de corriente mediante la técnica de parches de membrana (*patch-clamp*), en la modalidad de célula entera (*whole-cell*). Los microelectrodos utilizados para el registro en célula entera se fabricaron a partir de capilares de borosilicato. Estos se estiraron por calentamiento con ayuda de un estirador para micropipetas (P-87, Sutter Instrument, Novato CA, USA) y posteriormente su punta fue pulida con calor mediante una microforja (Narishige-USA, MF-830, Amityville, NY, USA). El valor de la resistencia de entrada de los microelectrodos fue 3–6 M Ω . La solución interna utilizada en el electrodo de registro contenía en mM: 120 KSO₃CH₄, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na; pH: 7.3, osmolaridad: 285 mOsm/l.

FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO

Como se ha descrito previamente, el Ca²⁺ intracelular activa la maquinaria molecular necesaria para la fusión de las vesículas sinápticas y la liberación de su contenido. No obstante,

esta no es la única función presináptica que desempeña este catión en lo que concierne a la transmisión sináptica. También juega un papel muy importante en las diferentes formas de plasticidad presináptica que se han identificado hasta hoy. En un principio, los investigadores reconocieron cuatro diferentes formas de plasticidad sináptica en función de su duración, que provocaban un aumento en la fuerza sináptica durante períodos de tiempo diferentes: la aumentación (menos de 10 ms), la facilitación por pulso pareado (10–200 ms) y la potenciación a corto plazo (1–20 min), aunque aquí también cabe la potenciación a largo plazo (más de 20 min); sólo las dos primeras correspondían a un fenómeno presináptico. A estas dos formas de plasticidad presináptica se les propusieron dos mecanismos distintos. Es decir, los sitios de unión que están involucrados en la liberación del transmisor no son los mismos que participan en los procesos de plasticidad presináptica [Zucker, 1994].

La facilitación fue identificada por primera vez por Katz y Miledi (1968), quienes explicaron el fenómeno del Ca^{2+} residual; este Ca^{2+} es derivado del primer pulso, el cual se suma al calcio que nuevamente entra a la presinapsis durante la segunda estimulación, lo cual aumenta la probabilidad de liberación. En este trabajo, el fenómeno de la facilitación de la liberación del neurotransmisor causado por un mecanismo presináptico se utilizó como paradigma experimental.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para determinar la participación de canales iónicos presinápticos en la sinapsis corticoestriatal se utilizó el protocolo de facilitación por pulsos pareados (FPP). Los estímulos se programaron y enviaron con ayuda de una computadora y una unidad de estimulación (Digitimer, DS2, Hertfordshire, UK) conectada a un electrodo concéntrico bipolar. Este electrodo fue posicionado en la unión de la corteza con el cuerpo caloso, mientras que el electrodo de registro se encontraba empalmando la neurona postsináptica en el estriado dorsal a una distancia no mayor a 2 mm del electrodo de estimulación. La duración de cada estímulo fue 100–400 μs , con un intervalo interestímulo de 70–100 ms y una intensidad de 1–5 V; los pares de estímulos fueron enviados cada 10 s (0.1 Hz). En todos los experimentos se midieron las amplitudes de las dos respuestas evocadas (S_1 y S_2), así como la proporción entre estas (S_2/S_1) (ver Figura 7). Las amplitudes fueron promediadas en períodos de 5 min (30 trazos en 5 min).

Se utilizaron Cd^{2+} (25 μM) y TEA (1 mM) para bloquear conductancias de Ca^{2+} y K^+ respectivamente de manera inespecífica. Para evidenciar la presencia funcional de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , se utilizó iberiotoxina a 10 nM para canales BK, y apamina a 100 nM para canales SK (Alomone, Jerusalem, Israel). Los datos obtenidos fueron digitalizados,

resguardados y analizados con ayuda de software especializado (SYSTAT software, San Jose, California, USA). Se utilizó la prueba paramétrica de t pareada para determinar la significancia estadística entre las muestras.

Se utilizó bicuculina (10 μ M) para eliminar la influencia de los receptores GABA_A durante el registro de los EPSPs. Los experimentos realizados para determinar la presencia funcional de los canales SK en presinapsis se llevaron a cabo en ausencia de bicuculina, debido a que presenta un efecto inhibitorio sobre los canales SK [Khaweled *et al.*, 1999]. Esta condición dificultó generar EPSPs subumbrales de amplitud estandarizada (2-5 mV), por lo que la estimulación enviada fue de mayor intensidad (4–5 V en este caso; 1–3 V en los demás experimentos) para obtener potenciales sinápticos de la amplitud deseada.

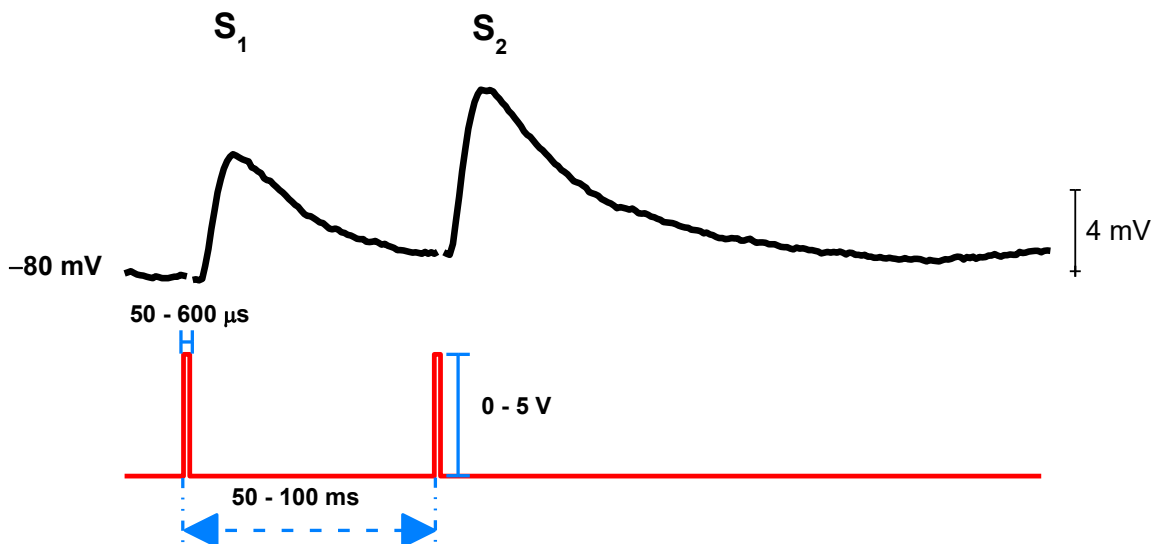


Figura 7. Protocolo de FPP. En la parte inferior se muestra la estimulación (trazo rojo) que se envió mediante el electrodo de estimulación, en donde se pueden discernir dos pulsos de duración y amplitud determinada, separados por un periodo de tiempo constante durante el experimento. En la parte superior se muestra el registro en fijación de voltaje de un par de EPSPs (trazo negro) en donde se observan el par de respuestas obtenidas, denominadas S₁ y S₂. La facilitación se ajustó en base a que S₂ fuera de mayor amplitud que S₁.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEMS

Se realizó el registro electrofisiológico con la técnica del *patch-clamp* en la modalidad de célula entera de las NEMs, las cuales fueron identificadas electrofisiológicamente (ver Figura 8) para asegurar de que se esté trabajando con este tipo de neurona; para esto se realizaron curvas de intensidad corriente-voltaje (I-V) (8-A y B), y se analizó el patrón de disparo de las neuronas registradas (8-C).

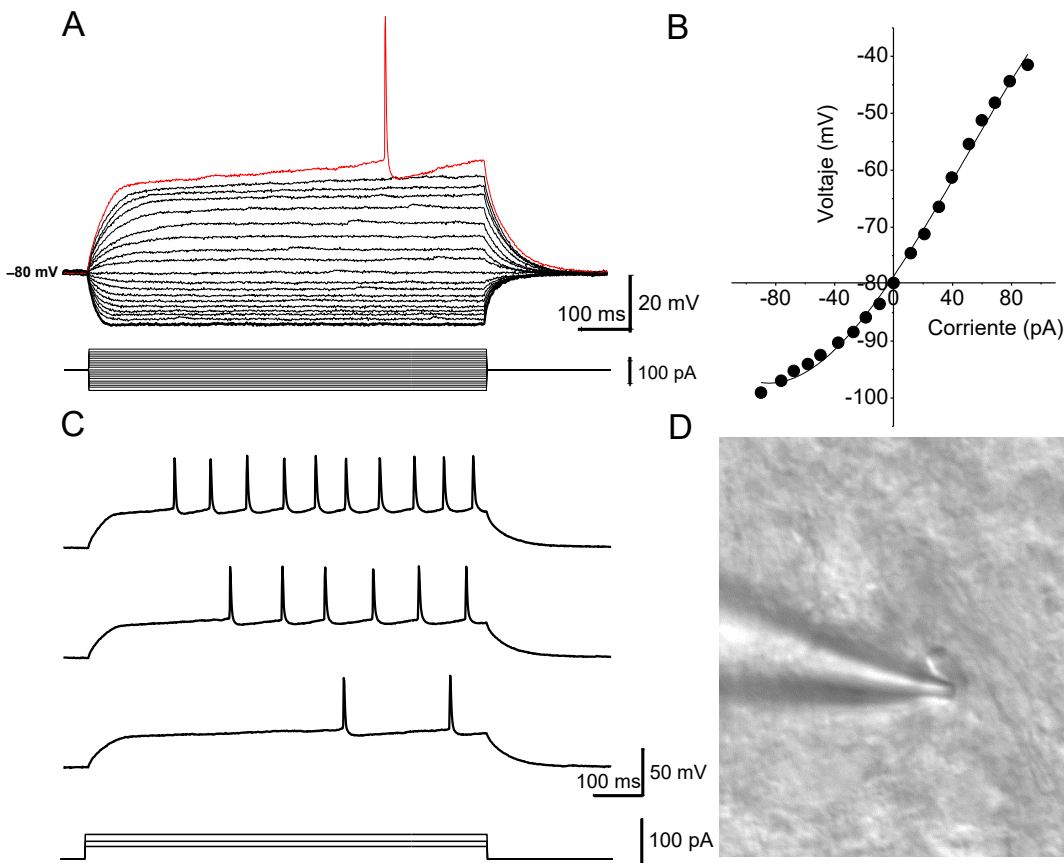


Figura 8. Identificación electrofisiológica de una neurona espinosa mediana (NEM) del estriado de rata. **A**, registro en fijación de corriente (I) del voltaje (V) de membrana a diferentes valores de estimulación. La estimulación se realizó a manera de pulsos cuadrados de corriente de 800 ms de duración; nótese el retraso en la aparición del potencial de acción. En **B** se grafica la relación I-V de los valores obtenidos en **A**; nótese la rectificación entrante por el cambio de pendiente en la curva a estímulos hiperpolarizantes. **C**, aumento de la frecuencia de disparo en función de la magnitud de la estimulación. Nótese el retraso en la aparición del primer disparo. **D**, captura de la neurona registrada.

Las características que se consideraron para la identificación de las NEMs fueron (1) la presencia de la corriente A, cuyo efecto se aprecia en el retraso en la aparición del potencial de acción (8-A) y (2) la rectificación entrante, que se observa como un cambio en la resistencia de entrada de la neurona al graficar la relación I-V (8-B).

PARTICIPACIÓN DE CANALES DE K^+ Y Ca^{2+} EN LA LIBERACIÓN

Una vez caracterizadas las NEMs, se prosiguió a realizar el protocolo de FPP para producir respuestas postsinápticas subumbrales (como se describió anteriormente) bajo distintas condiciones experimentales. En el primer bloque de experimentos se midió el efecto del bloqueo inespecífico de conductancias de Ca^{2+} y K^+ presinápticas sobre la facilitación por pulsos pareados, esperando que (1) el bloqueo de las conductancias de K^+ aumente la amplitud del potencial sináptico, pero disminuya la facilitación; y (2) que el bloqueo de las conductancias de Ca^{2+} produzca una disminución en la amplitud de los potenciales, pero un claro incremento en la facilitación.

En la Figura 9 se muestran los resultados de un experimento en el que se bloquearon inespecíficamente los canales Ca_v con Cd^{2+} a $25 \mu M$, lo cual provocó una disminución en la amplitud del par de respuestas postsinápticas S_1 y S_2 (9-B y C).

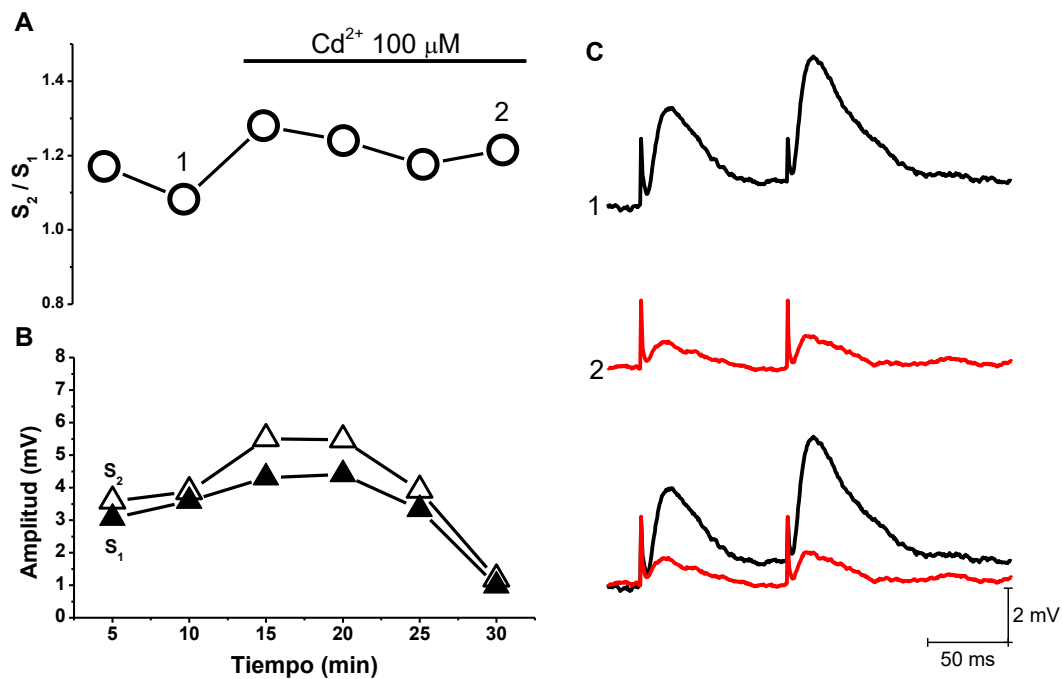


Figura 9. Efecto del bloqueo de canales de Ca^{2+} presinápticos sobre la facilitación. Se registraron los potenciales sinápticos (S_1 y S_2) de una NEM en condiciones control y en presencia de un bloqueador inespecífico de canales de Ca^{2+} , Cd^{2+} $25 \mu M$. En **A** se muestran los valores de la facilitación mediante el cociente de S_2 sobre S_1 (S_2/S_1); en **B** se muestran las amplitudes de S_2 (triángulos vacíos) y S_1 (triángulos rellenos). En ambas gráficas (**A** y **B**) se representan los promedios de periodos de tiempo de 5 min; estos datos se distribuyen a lo largo del tiempo transcurrido durante el experimento, y en la parte superior de **A** se especifica el tiempo en el que la preparación estuvo en presencia del bloqueador (después del minuto 10). En **C** se observan dos ejemplos representativos de EPSPs registrados, los cuales fueron tomados a diferentes tiempos del experimento en condiciones control (trazos negros, 10 min) y experimentales (trazos rojos, 30 min). Nótese la disminución en S_1 y S_2 al comparar ambos registros.

No obstante, la relación entre estas respuestas (S_2/S_1) tuvo un incremento, lo que indica un aumento en la facilitación (PFF: control = 1.08; experimental = 1.24) (10-A). Por lo tanto, se puede decir que una disminución general en la entrada de Ca^{2+} , que a su vez se relaciona con decremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las terminales de esta sinapsis, provoca un aumento en la facilitación por pulso pareado.

Posteriormente se realizó otro experimento en donde se bloquearon canales de K^+ inespecíficamente con TEA a una concentración de 1 mM (Figura 10). En presencia de este bloqueador se observa un aumento en las amplitudes de S_1 y S_2 (10-B y C), mientras que la facilitación disminuyó gradualmente con el tiempo (PFF: control = 1.3; experimental = 1.02) (11-A). A la disminución en la facilitación también se le conoce como depresión por pulsos pareados (DPP). Esta depresión se puede explicar con una mayor liberación de neurotransmisor durante la primera estimulación y una limitación en la cantidad de vesículas disponibles para el tiempo del segundo estímulo enviado, lo cual impide que S_2 tenga un valor mucho mayor que S_1 (10-C).

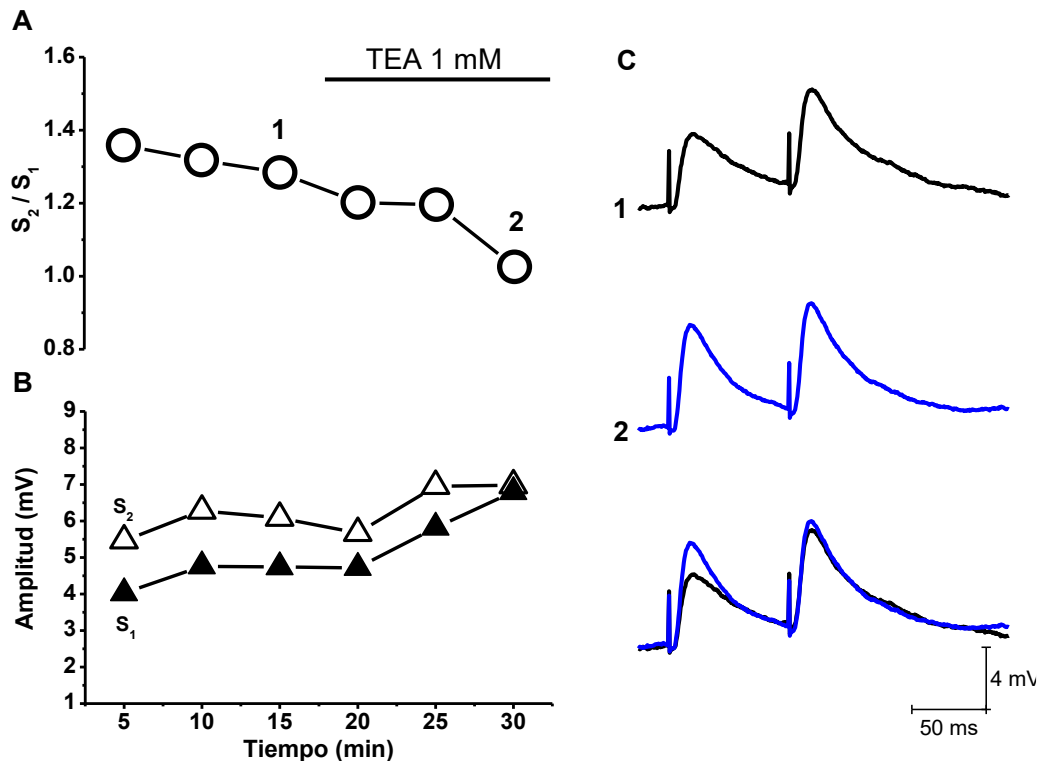


Figura 10. Efecto del bloqueo de canales de K^+ presinápticos sobre la facilitación. Los datos obtenidos de este experimento se muestran de la misma forma que en la Figura 10. Lo promedios de periodos de tiempo de 5 min de las amplitudes registradas (S_1 y S_2) (B) así como de la facilitación en base a la relación entre estas respuestas (S_2/S_1) (A) se distribuyen a lo largo del tiempo transcurrido del experimento. De igual modo, en C se observan registros representativos de EPSPs obtenidos en condiciones control (trazos negros, 15 min) y experimental (trazos azules, 30 min). Nótese el mayor aumento en la respuesta S_1 respecto al aumento de S_2 .

Por lo tanto, el efecto observado se debe a un fenómeno presináptico, es decir, el bloqueo de canales de K^+ presinápticos induce una mayor liberación de neurotransmisor y una DPP.

PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES BK

Una vez que se observó la contribución de los canales de K^+ presinápticos en la liberación del glutamato en la sinapsis corticoestriatal, la siguiente serie de experimentos consistió en demostrar la participación de los canales BK en la liberación mediante su bloqueo específico; para esto se utilizó IbTX a 10 nM, ya que a esta concentración se alcanza el efecto máximo del bloqueador [Galvez *et al.*, 1990; Bargas *et al.*, 1999].

Como se puede apreciar en la Figura 11-A y C, el efecto obtenido es similar al que se registró en condiciones en las que otras conductancias de K^+ fueron bloqueadas (comparar con la Figura 11): ambas respuestas, S_1 y S_2 (11-B y C), aumentaron mientras que la facilitación (cociente S_2/S_1) disminuyó (11-A).

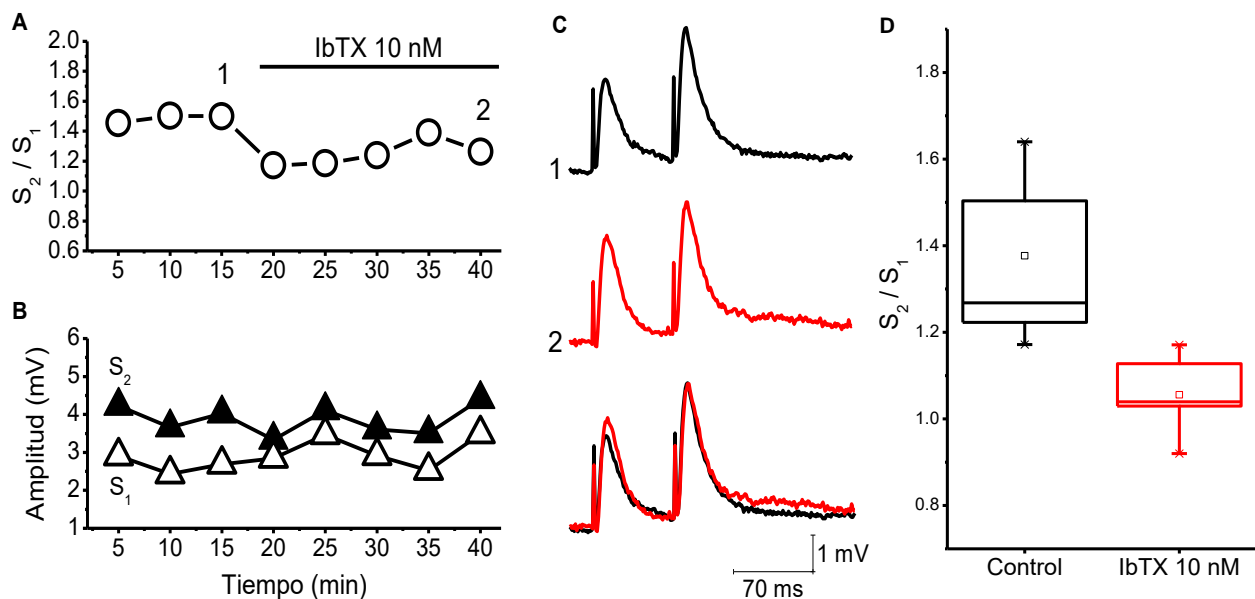


Figura 11. Efecto del bloqueo de canales BK presinápticos sobre la facilitación. En A-C se muestra un experimento representativo. En A se grafica la relación entre las respuestas (S_2/S_1) y en B se muestran las respectivas amplitudes de S_1 y S_2 respecto al tiempo. En C se aprecian trazos representativos del par de respuestas registradas antes (trazos negros, 15 min) y durante (trazos rojos, 40 min) la presencia de IbTX a 10 nM. En D, a manera de gráficos de cajas, se muestran los valores de S_2/S_1 en condiciones control (negro) y durante el bloqueo de canales BK (rojo) del total de seis experimentos realizados.

Se realizaron un total de seis experimentos, cuyo análisis estadístico se muestra en la Figura 11-D. En todos los casos se observó una disminución en la facilitación (FPP: control = 1.377 ± 0.184 ; experimental = 1.056 ± 0.087 ; $n = 6$; $p < 0.01$, t de Student). Por lo tanto, se puede afirmar que, debido al cambio significativo en la facilitación, el bloqueo de canales BK ocurre a nivel presináptico y esto se ve reflejado en la liberación de neurotransmisor.

Una vez evidenciada la participación de los canales BK a nivel presinapsis, se realizaron experimentos para demostrar la participación de los canales BK en la respuesta postsináptica, como ya se había sido realizado previamente (Pineda *et al.*, 1992). Para esto se realizaron registros con pulsos cuadrados de corriente en presencia de IbTX a 10 nM (Figura 12). Al comparar los potenciales de acción repetitivos en condiciones control respecto a las experimentales, se puede observar un aumento en la frecuencia inicial del tren de disparos (12-A); además, el bloqueo de canales BK provoca un aumento en la duración del potencial de acción seguido de la desaparición del PPHr (12-B). Esto implica una contribución importante sobre la repolarización y el componente rápido del PPH.

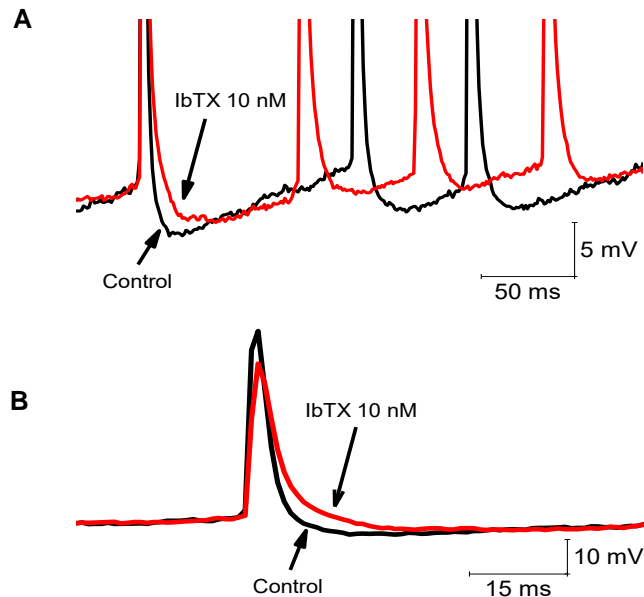


Figura 12. El bloqueo de los canales BK postsinápticos afecta la repolarización y el PPHr. En la parte superior (A) se comparan trenes de potenciales de acción obtenidos en condiciones control (trazos negros) y en presencia de IbTX 10 nM (trazos rojos). En la parte inferior (B) se compara un solo potencial de acción con mayor resolución. Nótese el aumento en la duración del potencial de acción y la disminución del PPHr.

PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES SK

Al haber determinado la presencia funcional de los canales BK en las terminales glutamatérgicas de corteza hacia el estriado, y confirmado su papel en las propiedades de disparo de las NEMs, se decidió realizar la misma metodología para los canales SK. En la Figura 13 se muestra un experimento donde se bloquearon estos canales con apamina a 100 nM, ya que a esta concentración se observa un efecto máximo [Wei *et al.*, 2005; Bargas *et al.*, 1999].

No hubo cambios aparentes en la facilitación (13-A), aunque al comparar los registros control con los experimentales (13-C), se puede apreciar un ligero incremento en la amplitud de los EPSPs en condiciones experimentales, lo que sugiere un efecto postsináptico de la apamina.

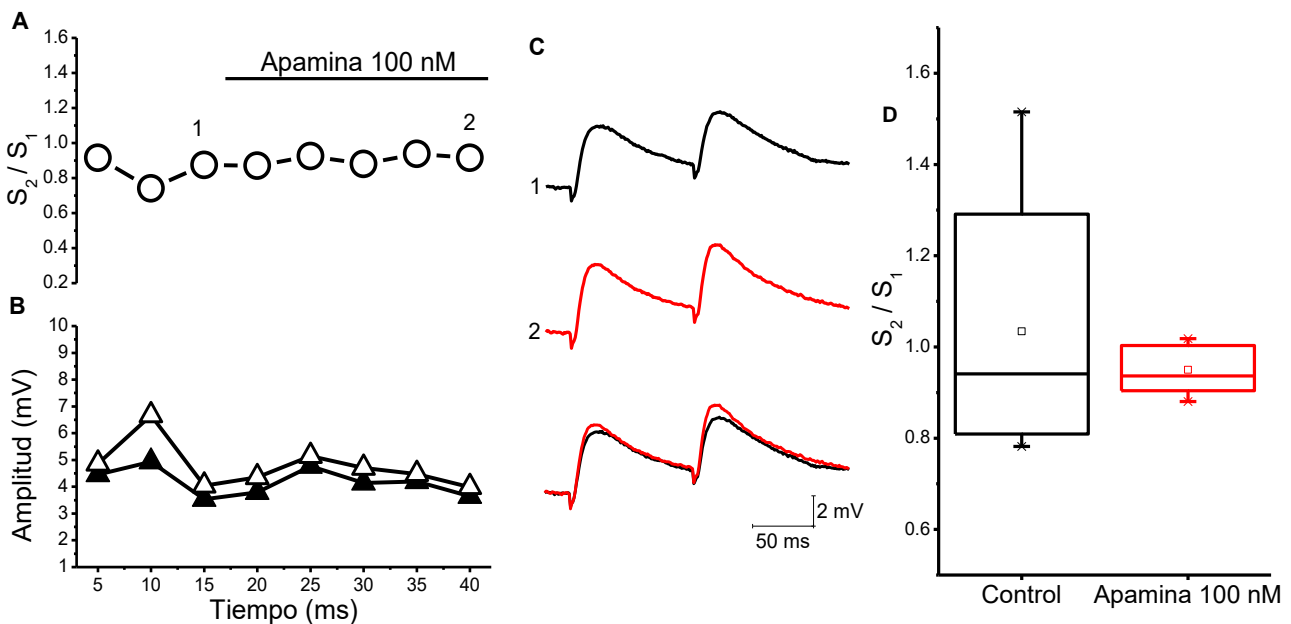


Figura 13. Bloqueo de los canales SK y su efecto en la presinapsis. Los datos se representan de la misma manera que en la Figura 12. En A y en B se grafican la relación S_2/S_1 y las amplitudes respectivamente, en función del tiempo durante un experimento donde se bloquearon específicamente canales SK con apamina 100 nM. En C se muestran ejemplos de EPSPs control (trazos negros, 15 min) y experimentales (trazos rojos, 40 min); nótese el ligero aumento en el par de respuestas sinápticas al añadir el bloqueador. Se realizaron un total de 6 experimentos, cuyo valor de facilitación (S_2/S_1) en condiciones control y experimentales se representan en D.

En la Figura 13-D se muestran los valores de S_2/S_1 de seis experimentos hechos bajo las mismas condiciones que el descrito anteriormente. En situaciones normales hubo una varianza considerable en la relación S_2/S_1 , debida a que algunos valores mostraron una DPP en lugar de una facilitación. En todos los experimentos se observó un incremento en S_1 y S_2 , como se puede ver en el ejemplo en 13-C. No obstante, el bloqueo de canales SK no indujo un cambio significativo en la relación S_2/S_1 (FPP: control = 1.03 ± 0.27 ; experimental = 0.95 ± 0.06 ; $n = 7$; $p > 0.05$, t de Student).

Debido a estos resultados, se prosigió a observar la contribución de los canales SK a las propiedades de disparo de las NEMs. Como se puede apreciar en la Figura 14, la generación del PPHm se ve inhibida por el bloqueo de estos canales, y esto se ve reflejado en la frecuencia inicial de una serie de disparos repetitivos (14-A).

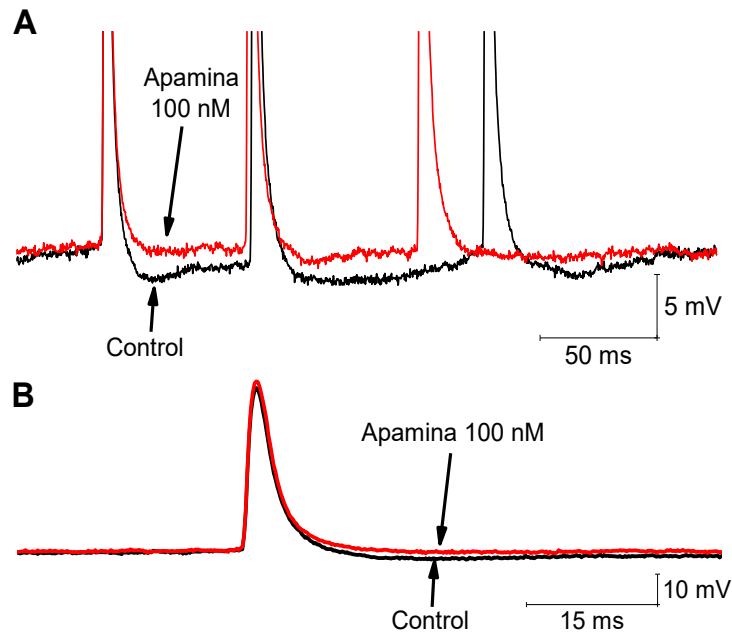


Figura 14. El bloqueo de canales SK postsinápticos afecta el PPHm. Se comparan potenciales de acción repetitivos (A) y unitarios (B) en la ausencia (trazos negros) y en la presencia (trazos rojos) de apamina a 100 nM. Nótese que la apamina disminuye el componente mediano del PPH, y que esto provoca un ligero aumento en la frecuencia inicial de disparo en A.

DISCUSIÓN

El presente trabajo arroja evidencias sobre la presencia presináptica de los canales K_{Ca} en la sinapsis corticoestriatal con una aproximación electrofisiológica utilizando el paradigma de la facilitación de la liberación. Además, se confirman las aportaciones de estos canales a las propiedades activas de las NEMs mediante el análisis de sus potenciales de acción. Mientras que las funciones presinápticas involucran la modulación de la liberación de glutamato, las postsinápticas se relacionan con la excitabilidad y posiblemente con la integración sináptica.

LA FPP COMO MÉTODO PARA DETERMINAR FACTORES PRESINÁPTICOS

La liberación del neurotransmisor es un fenómeno probabilístico, es decir, que depende de muchos factores que provocan que la cantidad de neurotransmisor sea variable [Boyd y Martin,

1956]. Con base en este principio, la facilitación es un fenómeno que es función de la probabilidad de liberación, la cual en este caso se encuentra en términos de la concentración de Ca^{2+} en las terminales sinápticas. El mecanismo subyacente es que el Ca^{2+} residual que se suma al que proviene de las corrientes entrantes de Ca^{2+} durante un potencial de acción aumenta la probabilidad de liberación [Katz y Miledi, 1968].

Se ha observado en este y otros trabajos que cuando se disminuye la probabilidad de liberación mediante el bloqueo de conductancias de Ca^{2+} presinápticas, la cantidad de neurotransmisor liberado disminuye y la facilitación por pulso pareado se ve incrementada [no se entiende] (Figura 9) [Debanne *et al.*, 1996; Barral *et al.*, 2001; Lovinger *et al.*, 1994]. Esto se debe a que la correlación entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la liberación no es lineal, implicando que los cambios pequeños en la concentración de este catión, en este caso atribuido al bloqueo de canales de Ca^{2+} , repercuten fuertemente en la cantidad de neurotransmisor liberado, y por lo tanto en el nivel de facilitación medido [Zucker, 1993; Mintz, Sabatini y Regehr, 1995].

Si bien la activación de canales Ca_v es muy importante para llevar a cabo la liberación *per se*, la contribución de los canales de K^+ presinápticos representa un componente modulador para este proceso [Roeper y Pongs, 1996]. En condiciones en las que la probabilidad de liberación aumente por la inactivación de canales de K^+ (Figura 10) se observa un efecto totalmente contrario a cuando se bloquean canales de Ca^{2+} : un aumento en la amplitud de la respuesta postsináptica, y una disminución en la facilitación, o bien, una depresión; esto es un dato que se ha confirmado durante el bloqueo de otras conductancias de K^+ [Debanne *et al.*, 1996; Barral *et al.*, 2001]. Este fenómeno se describe como un agotamiento de las vesículas ancladas al sitio activo, y está relacionado con un incremento significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; [Neher y Sakaba, 2008].

LA IMPORTANCIA DE LOS CANALES BK: PRESENCIA A NIVEL PRESINÁPTICO Y POSTSINÁPTICO

Debido a que los cambios en la facilitación están mediados por la actividad de los canales iónicos presinápticos, el protocolo de FPP se ha utilizado para demostrar la presencia funcional específica de canales iónicos cuando no es posible su registro unitario en las terminales presinápticas [Meir *et al.*, 1999]. Este es el caso de las terminales corticales que se encuentran en el estriado.

Durante el bloqueo específico de canales BK con IbTX 10 nM se observó una disminución en la facilitación, el cual es un efecto similar al registrado durante el bloqueo de otras conductancias de K^+ (comparar Figuras 10 y 11); esto es congruente con los resultados obtenidos

en estudios realizados en otras sinapsis [Hu *et al.*, 2001; Raffaelli *et al.* 2004]. Por lo tanto, estos resultados sugieren (1) la presencia de estos canales en el elemento presináptico y una (2) participación en la liberación de glutamato, ya que su bloqueo específico causa una disminución en la facilitación; se ha demostrado que estos canales tienden a modular la cantidad liberada de glutamato sobre otros neurotransmisores [Martire *et al.*, 2010].

Los canales de K^+ son un mecanismo inhibitorio en la excitabilidad neuronal sensible al propio voltaje de la membrana, sin embargo, los canales BK representan un sistema dependiente del voltaje y del Ca^{2+} generado por las corrientes entrantes de Ca^{2+} durante los potenciales de acción que arriban a la terminal sináptica. Debido a esta propiedad, los canales BK se han propuesto como reguladores efectivos de la actividad de los canales Ca_v , e indirectamente de la liberación del neurotransmisor. Debido a la significancia de este canal sobre la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal, es probable que se encuentre en la cercanía de los sitios activos, o incluso en asociación estructural con canales Ca_v que son responsables de la liberación [Berkefeld *et al.*, 2006].

Se proponen dos maneras en que los canales BK participen en la liberación de glutamato en esta sinapsis: (1) debido a que los canales BK determinan la duración del potencial de acción, se puede inferir que su participación en la liberación se relaciona con la duración en la que los canales de Ca^{2+} permanecen activos y continúen elevando la $[Ca^{2+}]_i$; (2) estos contribuyen al control de la frecuencia de disparo mediante la generación del PPHr, por lo que disminuirían la frecuencia de activación de los canales Ca_v durante eventos de disparos repetitivos en la terminal sináptica.

Ahora bien, es este trabajo también se evidenciaron las aportaciones de los canales BK a las propiedades de disparo de las NEMs en términos de la repolarización y el PPHr. De forma similar, en trabajos previos realizados en otros laboratorios se resaltó la contribución importante de estos canales a la repolarización y al origen del componente rápido del PPH, además de la fuerte influencia que tiene la actividad de los canales Ca_v sobre su funcionamiento [Pineda *et al.*, 1992; Pérez-Garci *et al.*, 2003]. Con todo, los datos presentados aquí confirman que los efectos observados en estas investigaciones se deben por la actividad exclusiva de canales BK y no a la de otro tipo de canal de K^+ , ya que los bloqueadores utilizados anteriormente también afectan algunos canales de la familia K_v [Goldstein y Miller, 1993].

LOS CANALES SK EN LA SINAPSI CORTICOESTRIATAL

Los resultados expuestos en este trabajo no muestran una participación de los canales SK sobre la liberación de glutamato. No obstante, se puede apreciar una gran dispersión de los valores de S_2/S_1 en condiciones control (ver Figura 13), debido a que en el inicio de algunos experimentos se presentó FPP ($S_2/S_1 > 1$) y en otros una DPP ($S_2/S_1 < 1$). Esto se puede explicar en base a que en estos experimentos se administró una mayor estimulación extracelular para poder obtener EPSPs de una amplitud regular, debido a la influencia inhibitoria GABAérgica presente (ver Material y Métodos). Al enviar pulsos de mayor amplitud, se induce una mayor probabilidad de liberación por parte de las terminales glutamatérgicas, y esto se puede reflejar en una depresión. Este fenómeno se puede apreciar mejor cuando se compara la facilitación en condiciones control del bloque de experimentos de la Figura 11 (con bicuculina a 10 μ M, con estimulación normal; FPP = 1.38 ± 0.18) con los de la Figura 13 (sin bicuculina, con mayor intensidad de estimulación; FPP = 1.03 ± 0.27). Los datos de la Figura 11 presentan menor dispersión debido a que en todos los casos se midió una FPP, en contraste con los datos de la Figura 13. Con todo, aunque se parta desde una DPP en condiciones control, todavía es posible demostrar algún mecanismo presináptico que aumente la probabilidad de liberación (en este caso la inactivación de canales SK) cuyo efecto favorezca aún más la depresión. Sin embargo, este no fue el caso: los valores de S_2/S_1 no cambiaron significativamente en condiciones experimentales.

A diferencia de los canales BK, los canales SK contribuyen en la generación del componente mediano (10-500 ms) del PPH [Stocker, Krause y Pedarzani, 1999]; esto les confiere una regulación de la excitabilidad durante períodos de tiempo relativamente más prolongados, mientras que los canales BK se limitarían a eventos discretos de un solo potencial de acción [Hille, 1992; Berkefeld *et al.*, 2010]. Por lo tanto, de estar presentes a nivel presináptico, es posible que el protocolo experimental utilizado no sea capaz de evidenciar la participación de los canales SK sobre en la liberación. De esta forma, sería necesario utilizar otros protocolos que permitan apreciar la dinámica de la liberación bajo períodos de tiempo más largos [Barroso-Flores *et al.*, 2015].

Por consiguiente, nuestro estudio muestra que de los canales K_{Ca} , sólo los K_{Ca1} o BK se encuentran a nivel presináptico y su funcionamiento modula la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal. Sin embargo, a nivel postsináptico el panorama es diferente: tanto los canales BK como los SK contribuyen a la excitabilidad de las NEMs de manera diferente.

Previamente se demostró la importancia de los canales SK para la generación del PHHm en estas neuronas, así como la limitación que ofrecen a la frecuencia de disparo [Pineda *et al.*, 1992]. En este trabajo se confirma este papel inhibitorio de los canales SK sobre el patrón de disparo de las NEMs. Sin embargo, recientemente se ha identificado una función más de estos canales a nivel dendrítico [Arias-García *et al.*, 2013]: en las dendritas de las NEMs se encuentra una alta densidad de canales Ca_v que generan potenciales y mesetas de Ca^{2+} cuando se estimulan significativamente las fibras corticales que hacen sinapsis con estas neuronas; los canales SK, por otro lado, impiden que se propaguen estos potenciales y mesetas hacia el soma. De esta manera, los canales SK representarían un elemento relevante en la sinapsis corticoestriatal a nivel postsináptico, en cuanto a la inhibición de la generación y propagación de potenciales de Ca^{2+} durante la integración sináptica en las dendritas. No obstante, los canales SK no necesariamente realizan esta contribución inhibitoria en las dendritas de otras neuronas [Benhassine y Berger, 2008]. Por consiguiente, los canales K_{Ca} pueden presentar diferentes distribuciones subcelulares que afectan la transmisión e integración sináptica para cada sinapsis en el SN. En la sinapsis corticoestriatal, el arreglo espacial y funcional de los canales K_{Ca} indica una especialización para cada tipo de canal (ver modelo en Figura 15): mientras que los canales BK modulan la liberación a nivel de las terminales mediante la probable inactivación de los canales Ca_v durante un potencial de acción, los canales SK regulan principalmente la integración de la información a nivel de las dendritas mediante la inhibición de la excitabilidad membranal durante la entrada de Ca^{2+} .

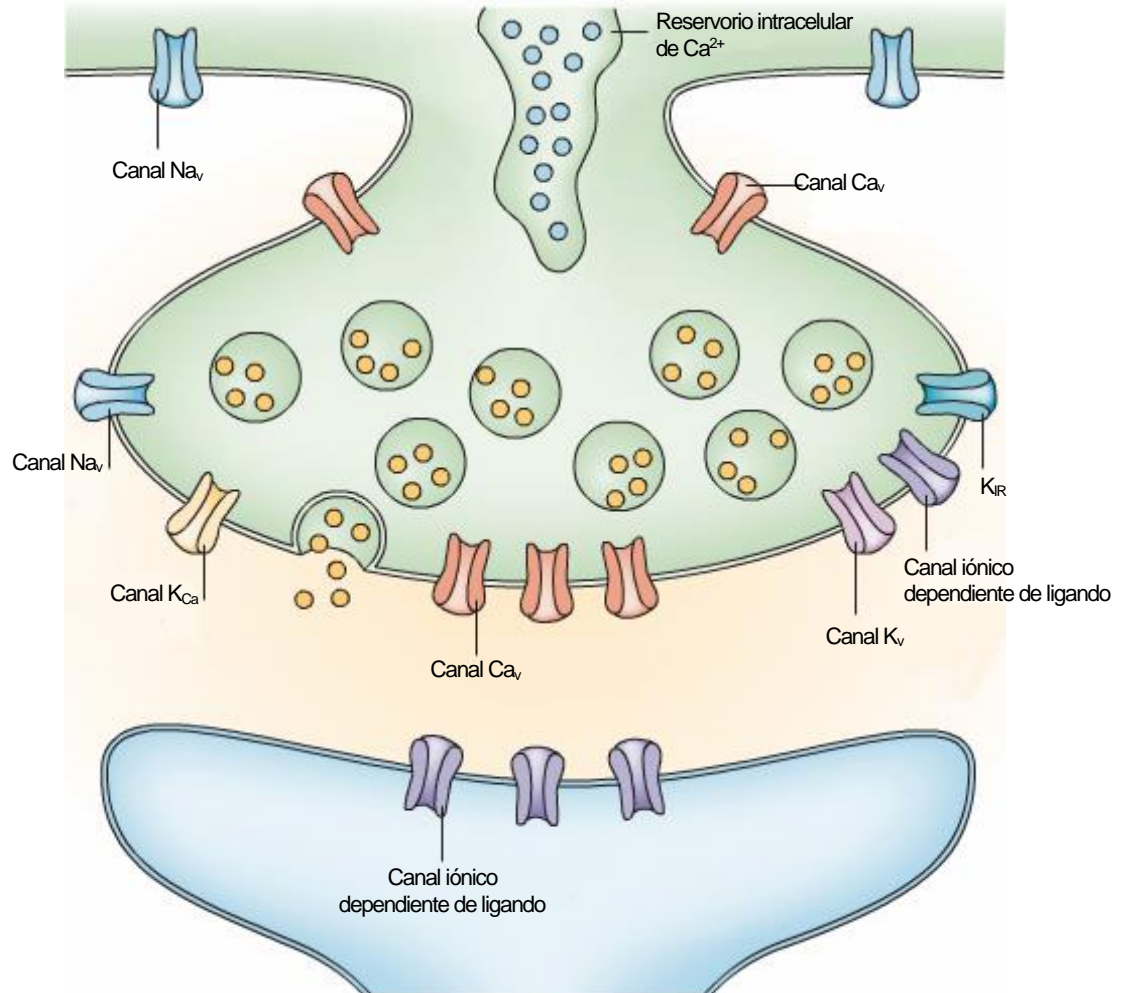


Figura. 15. Canales iónicos en la sinapsis corticoestriatal. Aquí se representa un modelo generalizado de la sinapsis corticoestriatal. En la parte superior se muestra una terminal sináptica proveniente de la corteza como el elemento presináptico, el cual hace sinapsis con una espina dendrítica de una NEM. El arreglo de los canales iónicos presinápticos se muestra de una manera específica: los canales Ca_v se encuentran en la cercanía de los sitios activos conformando los dominios de Ca^{2+} , mientras que los canales K_v y K_{Ca} también están en la vecindad modulando la actividad de los canales de Ca^{2+} . Otros canales que aparentemente no participan en la liberación permanecen en regiones relativamente más alejadas del sitio activo. Modificado de Engelman y MacDermott, 2004.

CONCLUSIONES

Finalmente, tomando en cuenta los resultados obtenidos del presente estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En la sinapsis corticoestriatal, a nivel presináptico los canales K_{Ca} , de tipo BK participan en la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal.
2. A nivel postsináptico, los canales BK contribuyen en la repolarización y son los responsables del PPHr en las NEMs.
3. Aunque los canales SK al parecer no participan en la liberación, están presentes a nivel de postsináptico y desempeñan un papel inhibitorio en el patrón de disparo de las NEMs generando el PPHm.

REFERENCIAS

- Aguan D., Wei, G. Gutman, R. Aldrich, K. Chandy, S Grissmer, H. Wulff. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews* 57: 463-472.
- Arias-García M., D. Tapia, E. Flores-Barrera, J. Pérez-Ortega, J. Bargas, E. Galarraga. 2013. Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Frontiers in Systems Neuroscience* 7:63.
- Ashcroft F. 2000. Ion Channels and Disease. Elsevier Ed.
- Augustine, G., F. Santamarina, K. Tanaka. 2003. Local Calcium Signaling in Neurons. *Neuron* 40: 331-346.
- Augustine, G. 2004. [1] Neural Signaling. En: Purves, D., G. Augustine, D. Fitzpatrick, W. Hall, A. LaMantia, J. McNamara, S. Williams (eds.), *Neuroscience* 3rd ed. Sinauer Associates Inc.
- Bargas J., G. Ayala, C. Vilchis, J. Pineda y E. Galarraga. 1999. Ca²⁺-activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 2(88): 479-488.
- Barral, J., Galarraga, E., & Bargas, J. 1999. Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Brain Research Bulletin*, 49(4), 285–289. doi:10.1016/S0361-9230(99)00061-1
- Barral, J., Poblette, F., Mendoza, E., Pineda, J., Galarraga, E., & Bargas, J. 2001. High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by ω -agatoxin TK. *European Journal of Pharmacology*, 430(2-3), 167–173. doi:10.1016/S0014-2999(01)01388-7
- Barral, J., Toro, S., Galarraga, E., & Bargas, J. 2000. GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Neuroscience Letters*, 283(1), 33–36. doi:10.1016/S0304-3940(00)00909-5
- Barroso-Flores J., M. Herrera-Valdez, V. Lopez-Huerta, E. Galarraga, J. Bargas. 2015. Diverse Short-Term Dynamics of Inhibitory Synapses Converging on Striatal Projection Neurons: Differential Changes in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Neural Plasticity* 2015: 1-13. doi: 10.1155/2015/573543
- Bartschat D., M. Blaustein. 1985. Calcium-activated potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *Journal of Neurophysiology* 361: 441-457.
- Benhassine N., T. Berger. 2005. Homogeneous distribution of large-conductance calcium-dependent potassium channels on soma and apical dendrite of rat neocortical layer 5 pyramidal neurons. *European Journal of Neuroscience* 21: 914–926. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03934.x
- Berkefeld, H., Fakler, B., & Schulte, U. 2010. Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiological reviews*, 90(4), 1437–59. doi:10.1152/physrev.00049.2009
- Berkefeld, H., C Sailer, W. Bild, V. Rohde, Jörg-Oliver Thumfart, S. Eble, N. Klugbauer, E. Reisinger, J. Bischofberger, D. Oliver, Hans-Günther Knaus, U. Schulte, B. Fakler. 2006. BK_{Ca}-Ca_v Channel Complexes Mediate Rapid and Localized Ca²⁺-Activated K⁺ Signaling. *Science* 5799(314): 615-620. doi: 10.1126/science.1132915

- Bolam, J. P., & Ellender, T. J. 2016. Histamine and the striatum. *Neuropharmacology*, 106, 74–84. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.013
- Boyd I., A. Martin. 1956. The End-plate Potential in mammalian Muscle. *Journal of Physiology* 132: 74-91.
- Contet, C., S. Goulding, D. Kuljis, A. Barth. 2016. BK Channels in the Central Nervous System. *International Review of Neurobiology* 128:281-342. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irn.2016.04.001>
- Debanne, D., Guérineau, N., Gähwiler, B., & Thompson, S. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of physiology*, 491 (Pt 1), 163–76.
- Dopico, A., A. Bukiya, G. Martin. 2014. Ethanol modulation of mammalian BK channels in excitable tissues: molecular targets and their possible contribution to alcohol-induced altered behavior. *Frontiers in Physiology*. 466(5): 1-13.
- Edgington, D. R., & Stuart, A. E. 1981. Properties of tetraethylammonium ion-resistant K⁺ channels in the photoreceptor membrane of the giant barnacle. *The Journal of general physiology*, 77(6), 629–46.
- Engelman H., A. MacDermott. 2004. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 135-145. doi:10.1038/nrn1297.
- Gabel, L. A., & Nisenbaum, E. S. 1998. Biophysical characterization and functional consequences of a slowly inactivating potassium current in neostriatal neurons. *Journal of neurophysiology*, 79(4), 1989–2002.
- Galarraga E., C. Vilchis, T. Tkatch, H. Salgado, F. Tecuapetla, T. Perez-Rosello, E. Perez-Garci, E. Hernandez-Echegaray, D. Surmeier y J.argas. 2007. Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* 146: 537-554.
- Galvez A., G. Gimenez-Gallego, J. Reuben, L. Roy-Contancin, P. Feigenbaum, G. Kaczorowski, M. García. 1990. Purification and Characterization of a Unique, Potent, Peptidyl Probe for the High Conductance Calcium-activated Potassium Channel from Venom of the Scorpion *Buthus tamulus*. *The Journal of Biological Chemistry* 19(265): 11083-11090.
- Gerfen C. 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience* 2(9): 157-8.
- Gerfen C. y J. Bolam. 2010. [1] The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. En: Steiner J., K. Tseng (eds.). *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. (pp. 3-28). Elsevier B. V.
- Goldberg J. y C. Wilson. 2010. The Cholinergic Interneurons of the Striatum: Intrinsic Properties Underlie Multiple Discharge Patterns. En: *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (pp 133-149). Elsevier B. V.
- Goldstein S., C. Miller. 1993. Mechanism of Charybdotoxin Block of a Voltage-Gated K⁺ Channel. *Biophysical Journal* 65: 1613-1619.
- Gribkoff V., J. Starrett, S. Dworetzky, P. Hewawasam, C. Boissard, D. Cook, S. Frantz, K. Heman, J. Hibbard, K. Huston, G. Johnson, B. Krishnan, G. Kinney, L. Lombardo, N. Meanwell, P. Molinoff, R. Myers, S. Moon, A. Ortiz, L. Pajor, R. Pieschl, D. Post-Munson, L. Signor, N. Srinivas, M. Taber, G. Thalody, J. Trojnacki, H. Wiener, K. Yeleswaram, S. Yeola. 2001. Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. *Nat Med* 7:471–477.

- Groenewegen H. H. Uylings. 2010. [20] Organization of Prefrontal-Striatal Connections. En: Steiner J., K. Tseng (eds.). *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. (pp 353-365). Elsevier B. V.
- Hammond, C. 2008. Cellular and Molecular Neurophysiology 3rd ed. *Elsevier*. 342-367 pp.
- 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 Ca²⁺ conductance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(9), 3334–42.
- Hille, B. 2001. Ionic Channels of Excitable Membranes. *Sinauer Associates*. 814 pp.
- Hu, H., Shao, L. R., Chavoshy, S., Gu, N., Trieb, M., Behrens, R., ... Storm, J. F. (2001). Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9585–97.
- Jose, X., Pineda, J. C., Rodriguez, C., Mendoza, E., Galarraga, E., Bargas, J., & Barral, J. (2007). Delta opioids reduce the neurotransmitter release probability by enhancing transient (KV4) K⁺-currents in corticostriatal synapses as evaluated by the paired pulse protocol. *Neuroscience letters*, 414(2), 150–4. doi:10.1016/j.neulet.2006.12.010
- Kandel E., S. Siegelbaum, 2013. [9] Signaling at the Nerve-Muscle Synapse: Directly Gated Transmission. En: Kandel E., J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, A. Judsperth (eds.). *Principles of Neural Science* 5th ed, (pp 177-188), McGraw Hill.
- Katz B., R. Miledi. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *Journal of Neurophysiology* 95: 481-492.
- Kawaguchi, Y. 1997. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neuroscience Research* 27: 1–8.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in neurosciences*, 18(12), 527–35.
- Kim, J., & Hoffman, D. 2008. Potassium channels: newly found players in synaptic plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 14(3), 276–86. doi:10.1177/1073858408315041
- Kita, T., Kita, H., & Kitai, S. 1984. Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Research*, 300(1), 129–139. doi:10.1016/0006-8993(84)91347-7
- Knaus, H., C. Schwarzer, R. Koch, A. Eberhart, G. Kaczorowski, H. Glossmann, G. Sperk. 1996. Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 955–63.
- Lovinger, D. M., Merritt, A., & Reyes, D. 1994. Involvement of N- and non-N-type calcium channels in synaptic transmission at corticostriatal synapses. *Neuroscience*, 62(1), 31–40.
- 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.
- Martire, M., Barrese, V., D'Amico, M., Iannotti, F. A., Pizzarelli, R., Samengo, I., Tagliatela, M. 2010. Pre-synaptic BK channels selectively control glutamate versus GABA release from cortical and hippocampal nerve terminals. *Journal of neurochemistry*, 115(2), 411–22. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06938.x

- Meir A., S. Ginsburg, A. Butkevich, S. Kachalsky, I. Kaiserman, R. Ahdut, S. Demircoren, R. Rahamimoff. 1999. Ion Channels in Presynaptic Nerve Terminals and Control of Transmitter Release. *Physiological Reviews* 3(79): 1019-1088.
- Meneses, D., Mateos, V., Islas, G., & Barral, J. 2015. G-protein-coupled inward rectifier potassium channels involved in corticostriatal presynaptic modulation. *Synapse (New York, N.Y.)*, 69(9), 446–52. doi:10.1002/syn.21833
- Meneses, D., Vega, A. V., Torres-Cruz, F. M., & Barral, J. 2016. KV1 and KV3 Potassium Channels Identified at Presynaptic Terminals of the Corticostriatal Synapses in Rat. *Neural plasticity*, 2016, 8782518. doi:10.1155/2016/8782518
- Miller, R. 1998. Presynaptic Receptors. *Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 201–227. doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.201
- Mintz, I., B. Sabatini, W. Regehr. 1995. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15: 675–688.
- Neher E., T. Sakaba. 2008. Ion Channels in Presynaptic Nerve Terminals and Control of Transmitter Release. *Neuron* 59: 861-872. doi 10.1016/j.neuron.2008.08.019
- Nisenbaum, E. S., & Wilson, C. J. 1995. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(6), 4449–63.
- Pineda, J., 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), 287–94.
- Pérez-Garci, E., Bargas, J., & Galarraga, E. 2003. The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*, 14(9), 1253–6. doi:10.1097/01.wnr.0000081861.45938.71
- Plentz D., J. R. Wickens. 2010. [5] The Striatal Skeleton: Medium Spiny Projection Neurons and their Lateral Connections. En: *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Steiner J., K. Tseng (eds.), (pp 99-112). Elsevier B. V.
- Raffaelli, G., Saviane, C., Mohajerani, M., Pedarzani, P., & Cherubini, E. 2004. BK potassium channels control transmitter release at CA3–CA3 synapses in the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 557(1), 147–157. doi:10.1113/jphysiol.2004.062661
- Rama S., M. Zbili, D. Debanne. 2015. Modulation of spike-evoked synaptic transmission: The role of presynaptic calcium and potassium channels, *Biochim. Biophys. Acta* 9(1853): 1933-1939.
- Reiner A. 2010. [18] Organization of Corticostriatal Projection Neuron Types. En: *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Steiner J., K. Tseng (eds.), (pp. 223-2399). Elsevier B. V.
- Robitaille R., M. Charlton. 1992. Presynaptic Calcium Signals and Transmitter Release Are Modulated by Calcium-activated Potassium Channels. *The Journal of Neuroscience* 12(1): 297-305.
- Roeper, J., & Pongs, O. 1996. Presynaptic potassium channels. *Current opinion in neurobiology*, 6(3), 338–41.

- Sah, P. 1996. Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends in neurosciences*, 19(4), 150–4.
- Shepherd, G. 2004. [1] Introduction to Synaptic Circuits. En: Shepherd, G (eds.). *The Synaptic Organization of the Brain 5th Ed*, (pp 1-38). Oxford University Press.
- Siegelbaum S., D. Clapham, J. Schwartz. 2013. [11] Modulation of Synaptic Transmission: Second Messengers. En: Kandel E., J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, A. Judspeth (eds.). *Principles of Neural Science 5th ed.*, (pp 236-259), McGraw Hill.
- Song, X., Su, W., Chen, L., & Ji, J. 2010. Functional expression of large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels in lateral globus pallidus neurons. *Neuroscience*, 169(4), 1548–56. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.026
- Stockbridge, N., & Ross, W. N. 1984. Localized Ca²⁺ and calcium-activated potassium conductances in terminals of a barnacle photoreceptor. *Nature*, 309(5965), 266–8.
- Stocker, 2004. Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nature Reviews 5*: 758-770.
- Stocker M, M. Krause, P. Pedarzani. 1999. An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4662–4667
- Storm, J. 1987. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology* 385: 733-759. 385, pp. 733–759
- Tonini, R., T. Ferraro, M Sampedro-Castañeda, A. Cavaccini, M. Stocker, C. Richards, P. Pedarzani. 2013. Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate action potential-induced Ca²⁺ transients in hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 109: 1514–1524. doi:10.1152/jn.00346.2012
- Vergara C., L. Latorre, N. Marrion, J. Adelman. 1998. Calcium-activated potassium channels. *Current Opinion in Neurobiology* 8:321-329.
- Vergara R., C. Rick, S. Hernández-López, J. Laville, J. Guzman, E. Galarraga, D. Surmeier, J. Bargas. 2003. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *Journal of Physiology* 353: 169-182. doi: 10.1113/jphysiol.2003.050799
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., & Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 463–72. doi:10.1124/pr.57.4.9
- Wichmann T., M. DeLong. 2010. [43] Basal Ganglia. En: *Principles of Neural Science 5th ed.* Kandel, E, J. Schwartz, T. Jessell, S. Siegelbaum, A. Hudspeth (eds.), (pp982-998). McGrawHill.
- Wilson C. 2004. [9] Basal Ganglia. En: *The Synaptic Organization of the Brain 5th Ed.* Shepherd G., (eds.), (pp 361-414). Oxford University Press.
- Wilson, C., Y. Kawaguchi. 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(7), 2397–410.
- Zucker, R. 1993. Calcium and transmitter release. *Journal of physiology, Paris*, 87(1), 25–36.

Zucker, R. 1999. Calcium and activity-dependent synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 305-313.