



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

*Modulación presináptica
producida por opiáceos en sinapsis
corticales con el paleostriatum
augmentatum de la tortuga.*

TESIS

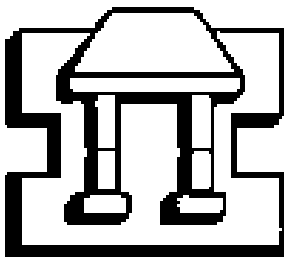
Que para obtener el Título de

BIÓLOGA

Presenta

Verónica Alba Velázquez

ASESOR: *Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero*



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el siguiente financiamiento: **1) Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México (IN204407)**; **2) Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 81518)**; **3) Programa de apoyo a los Profesores de Carrera de la Facultad de Estudios Profesionales Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPCA FES Iztacala-UNAM) 2009-2010** al **Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero**.

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias** en la **Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE)** de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo Agosto de 2007 a Noviembre de 2009.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

Proyecto Neurociencias, UIICSE. FES Iztacala, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi asesor de tesis, Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero por hacer posible la realización de este trabajo, por estar al pendiente, brindarme su apoyo y sus conocimientos. Y sobre todo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A mis Sinodales Dr. Bertha Segura Alegría, Dr. María Eugenia Garín, Dr. Mónica González Isais y al Biol. Hugo Castro Cortes, por dedicar tiempo a la revisión de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y agradezco a mis padres Jesús Alba Ávila y Alicia Velázquez Ríos, por darme la oportunidad de superarme profesionalmente, por que a pesar de mis errores siempre estuvieron incondicionalmente a mi lado, por el gran esfuerzo que han hecho para que tenga mejores oportunidades, gracias a sus consejos y por la motivación constante Gracias por creer en mí y apoyarme en todo, Los Amo.

A mis hermanos Koko y Petes por apoyarme y hacerme ver mis errores, los quiero mucho. A mis hermanas Adriana y Claudia, por mostrarme su apoyo siempre. A los pequeñitos Kevin y Kina por dar alegría a mi vida.

A mis amigos de la Facultad Betsa, Vero, Angy, Ale, Omar, Güera, Luchito, Chemo, por hacer de este viaje un travesía divertida.

A mis compañeros de Laboratorio, Lupita, Aarón y Ana que se convirtieron en buenos amigos.

A Javier, por el gran apoyo que me has dado, porque sabes ser muy buen amigo y sobre todo un buen compañero, porque contigo aprendo muchas cosas, gracias por creer en mí.

“Pocas cosas hay tan humillantes, como ver que otros hacen lo que tu decías imposible”

INDICE

INDICE.....	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Circuito de los ganglios basales.....	2
Evolución de los ganglios basales.....	5
La Transmisión sináptica.	6
La Sinapsis eléctrica.....	7
La Sinapsis química.....	7
Neurotransmisores.....	8
Modulación Sináptica.....	10
Modulación Presináptica.....	11
CANALES IÓNICOS.	12
Péptidos Opioides	13
Endorfinas	13
Enkefalinas	14
Dinorfinas	14
Receptores a opiáceos	14
Distribución de los péptidos opioides en el sistema nervioso central.....	16
Papel funcional de los receptores a opiáceos.....	17
Modulación sináptica por opiáceos	19
JUSTIFICACION	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
OBJETIVOS	21
General	21
Particulares.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Estimulación y Registro de potenciales de campo.....	22
Facilitación por pulso pareado.	23
Protocolo experimental.....	24
Fármacos Utilizados	26
Análisis de Datos	26
RESULTADOS	27
Efecto de la activación a Receptores de opiáceos tipo MU	27
B) Modulación presináptica por receptores a opiáceos tipo μ	29
CURVA DOSIS-RESPUESTA.....	30
Dosis respuesta	¡Error! Marcador no definido.
Modulación Presináptica de Opioides tipo Mu por canales de Calcio.....	31
Canales de Ca^{2+}	31
El papel del Ca^{2+} en la liberación	32
Efecto de ω -CgTx-GVI.....	33
Efecto de ω -AgTx TK.....	35
Módulación Presináptica de Opiáceos tipo MU por Canales de Potasio.....	36
CANALES DE POTASIO.	36
Modulación de los Canales de Potasio.....	37
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

RESUMEN

Estudios anatómicos de las últimas décadas indican que existen numerosas similitudes en la organización de los Ganglios Basales (GB) de los vertebrados amnióticos (reptiles, aves y mamíferos), es decir que el plan básico del sistema nervioso central de todos estos vertebrados presenta una organización estructural común; un ejemplo de ello es el cuerpo estriado de los mamíferos con el paleostriatum augmentum (PA) de los reptiles que es su equivalente anatómico.

En el cerebro de los cordados, la mayor concentración de opiáceos se encuentra en los ganglios basales. En el sistema nervioso los opiáceos endógenos son endorfinas, encefalinas, y dinorfinas; las cuales son codificadas por tres genes separados. Particularmente en la sinapsis glutamatérgica cortico-estriatal de la rata se han identificado dos tipos de receptor a péptidos opioides, se trata de los receptores Mu (μ) y Delta (δ), los cuales modulan la liberación de neurotransmisor a través de la regulación de canales de potasio presinápticos. Filogenéticamente las tortugas, como otros reptiles, tienen funciones motoras consideradas más simples que las de los mamíferos, lo que puede deberse a que presentan una corteza menos compleja que la de los mamíferos, por tal motivo se puede establecer el papel de los canales de potasio y calcio en la modulación presináptica, producida por la activación de los receptores a opiáceos tipo μ . Se utilizaron antagonistas no específicos de los canales de K^+ , para el K^+ se utilizaron bloqueadores no específicos como el TEA y la 4-AP. Para estudiar los canales de Ca^{2+} se utilizaron bloqueadores específicos: conotoxina GVIA (ω -CgTx-GVIA), agatoxina TK (ω -AgTx-TK).

Los datos obtenidos muestran que los potenciales de campo registrados presentan dos negatividades (N_1 y N_2), de los cuales la segunda es un potencial sináptico dependiente de calcio, ya que al bloquear con cadmio o en soluciones de bajo calcio este potencial desaparece. Por otro lado, observamos que la aplicación de 1 μ M de DAMGO (agonista del receptor μ) produjo un incremento en la facilitación por pulso pareado, la cual al parecer es dependiente de la concentración. Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la inhibición de la liberación de glutamato en estas terminales pudiera ser similar a la observada en los mamíferos, es decir, estar modulada por la activación de conductancias de K^+ , como en mamíferos. Nuestros datos muestran que el bloqueo de canales de calcio no disminuye el efecto del DAMGO sobre la liberación de glutamato, en la sinapsis corticoestriatal de la tortuga. Por otro lado la activación de los receptores μ no tuvo efecto en presencia de bloqueadores de canales de potasio. Por lo que nuestros resultados sugieren que la activación de receptores μ actúa a través de la modulación de canales de potasio en esta sinapsis, al igual que en mamíferos. Esto sugiere que la modulación por opiáceos es una función conservada al menos en la sinapsis corticoestriatal de los amniotas.

INTRODUCCIÓN

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

Las conexiones anatómicas de los GB están involucrados numerosos circuitos cortico-subcorticales, los cuales apoyan un amplio rango de funciones sensoriales, motoras, cognitivo emocionales y motivacionales del cerebro (Groenewegen, 2003). Estas conexiones son mejor apreciadas dentro del contexto del arreglo de los distintos núcleos que componen a los GB. Las principales estructuras son el núcleo caudado, putamen, globo pálido (GP), sustancia *nigra pars* y el subtálamo. Las principales aferentes a los GB son la corteza cerebral y el tálamo (Wilson, 2004).

Circuito de los ganglios basales

En particular, cuando hablamos de los GB de los mamíferos, nos referimos principalmente al cuerpo estriado, que es el principal núcleo de entrada a los GB, y al globo pálido que forman parte de la porción basal del telencéfalo. Actualmente se incluyen dentro de los GB a la sustancia nigra (SN), el área ventral tegmental (AVT), y el núcleo subtalámico (NST), debido a su cercana relación tanto anatómica como funcional con el estriado y el pálido (Chesselet y Delfs, 1996; Reiner et al, 1998; Wilson, 2004).

El neostriado constituye la principal entrada a los ganglios basales, pues las fibras aferentes que ingresan al neostriado provenientes de la corteza sensorial, motora y de asociación liberan glutamato (McGeer, et al., 1977; Molina, et al., 1999), y producen un patrón anatómico descrito por Ramón y Cajal como dendrítico cruciforme (Wilson, 1998), lo que significa que la fibra establece un curso relativamente recto a lo largo del tejido, cruzando sobre dendritas y dejando sinapsis *en passant*. Pero cabe destacar que esta no es la única vía para recibir información, también recibe información de los núcleos intralaminares del tálamo, recibe entradas dopaminérgicas

de la (SNr) y entradas serotoninérgicas del núcleo del Rafé dorsal, así como entradas del núcleo basolateral de la amígdala para el núcleo *accumbens* (Lovinger y Tyler, 1996). Se sabe que la mayor parte de las neuronas del neostriado son neuronas de proyección, que reciben el nombre de espinosas medianas por el gran número de espinas dendríticas que presentan, y casi la mitad de estas neuronas proyectan únicamente al segmento externo del globo pálido formando la vía indirecta, co-liberando encefalinas (ENK); mientras que la otra mitad proyecta al globo pálido interno y a la SNr, co-liberando Sustancia-P (SP), formando así la vía directa (Misgeld, et al., 1979; Smith, et al., 1998; Wilson, 1998); asimismo los axones de estas neuronas sintetizan, almacenan y liberan ácido γ -amino butírico (GABA). Además existen otras estirpes neuronales cuyos axones se quedan en el neostriado, estableciendo los diversos tipos de interneuronas propias de este núcleo, cuyas características se han determinado por registros intracelulares, técnicas de identificación inmunocitoquímica, con base al contenido de neuromoduladores y neurotransmisores que poseen, describiéndose de esta manera: interneuronas colinérgicas grandes (2% de las células del neostriado), células en canasta, que contienen GABA y parvalbumina (células no-espinosas que rodean a los somas de las neuronas espinosas medianas son cerca del 3 al 5% del total de la población neuronal) (Kita, 1993), células que contienen GABA, somatostatina y óxido-nítrico sintetasa (representan menos del 2% de la población neuronal) (Di-Figuralia y Aronin, 1990; Takagi, et al., 1983; Wilson, 2004).

En los reptiles las proyecciones corticales al estriado no se han estudiado en tanto detalle como en mamíferos y aves, pero se sabe que las proyecciones corticoestriatales provienen de las porciones visual, somatosensorial y auditiva del palio telencefálico, y hay cierta evidencia de que esta proyección es glutamatérgica. Tampoco han sido identificadas proyecciones del pálido hacia el tálamo dorsal, aunque de la misma forma en que ocurre con los mamíferos, y aves, en los reptiles un grupo de núcleos talámicos dorsales proyecta al estriado, además de que parece haber núcleos intralaminares de la línea media de los mamíferos, los cuales tienen similitudes en cuanto a su histoquímica, topografía y eferencias, aunque una proyección del pálido hacia este no ha sido demostrada. Tanto en aves como en reptiles el estriado está localizado más ventral y las regiones del palio descansan inmediatamente dorsal a

este, separadas por una lámina compuesta de células sin fibras, mientras que el tejido palial inmediato es la llamada cresta dorsal ventricular (DVR). Al igual que en las ratas, las interneuronas parvalbuminérgicas estriatales de las palomas y de las tortugas parecen ser especialmente ricas de entre todas las neuronas estriatales en cuanto a la cantidad de receptores AMPA, compuestos de subunidades GluR₁ y GluR₄, mientras que las neuronas estriatales de proyección son ricas en subunidades GluR₁, GluR₂ y GluR₃. Al igual que en las aves, en los reptiles algunos núcleos talámicos dorsomediales proyectan al estriado y tienen proyecciones esparcidas hacia áreas corticales, tales como el Wulst y partes de la DVR, en el caso de las aves, y la corteza dorsal, el engrosamiento palial y la DVR en el caso de los reptiles (Reiner et al, 1998). Se ha encontrado que la magnitud de la aferencia de ENK a las neuronas dopaminérgicas tegmentales varía entre mamíferos y reptiles, con una aferencia más prominente en serpientes, algunas lagartijas y en los primates. No obstante las neuronas de la SNr en aves y reptiles sí reciben aferencia estriatal de SP, y como en los mamíferos estas terminales de origen estriatal contactan neuronas de la SNr que son presumiblemente GABAérgicas.

En aves y reptiles la hipocinesia puede ser producida por la destrucción de neuronas dopaminérgicas tegmentales, además de que parece tener sus bases en una anomalía en la actividad del circuito estriado-pálido-tálamo, similar a lo que ocurre en los mamíferos. Las neuronas estriato-palidales que producen SP son muy abundantes en aves y reptiles, y pareciera ser que tienen un papel importante en el circuito motor que promueve el movimiento voluntario. Es posible que la ruta estriado-pálido-subtálamo que contiene ENK esté involucrada en la supresión de movimientos involuntarios en aves, y reptiles, como en el caso de los mamíferos, por lo que una activación concomitante de un conjunto apropiado de neuronas puede ser necesario para promover el movimiento voluntario e inhibir movimientos involuntarios en aves, reptiles y mamíferos, aunque la ruta de los GB al cerebro medio vía la SNr en estas tres clases de organismos también puede estar involucrada en promover el movimiento voluntario.

Evolución de los ganglios basales

Existen numerosas similitudes en la organización de los GB de vertebrados amnióticos (reptiles, aves y mamíferos), por lo que se piensa que esta organización ya estaba presente en los antepasados de este tipo de animales, de aquí la importancia del estudio en estas estructuras. Además, se ha señalado que deben existir diferencias mayores en la organización de los GB entre los amniotas y anamniotas actuales (peces y anfibios), sugiriendo que el buen desarrollo de los ganglios basales se llevo a cabo únicamente en la transición evolutiva de anamniotas a amniotas. Las características de la organización fundamental de los GB tal como se observa en los organismos amnióticos, ya se observa en el cerebro de los anfibios, cuyos antepasados dieron origen a vertebrados como los reptiles desde el periodo carbonífero (Marín, et al., 1998a y b; Reiner, et al., 1998). Al igual que en los mamíferos, los sistemas estriato-palidal dorsal y ventral tanto de reptiles como de aves tienen distintas conexiones con el cerebro anterior, el cerebro medio y el istmo, lo que permite suponer que hay una participación de circuitos parcialmente segregados en el sistema estriato-palidal tanto dorsal como ventral en todos los amniotas (Smeets, et al., 2000).

Dos poblaciones principales de neuronas de proyección han sido identificadas en las regiones dorsal y ventral del estriado de todos los amniotas, estos dos tipos de neuronas de proyección son espinosas de tamaño medio, y liberan GABA, pero difieren en el contenido de aminoácidos (Albin, et al., 1989; Graybiel, 1990; Reiner y Anderson, 1990; Reiner, et al., 1999), además de las neuronas espinosas de proyección (las cuales constituyen cerca del 90% de las neuronas del estriado en los mamíferos) el estriado dorsal y ventral de los amniotas contiene varios tipos de circuitos neuronales locales, un tipo está constituido por neuronas espinosas colinérgicas que están presentes en amniotas y al menos en algunos anfibios (Vincent y Reiner, 1987; Hoogland y Vermeulen-Van der Zee, 1990; Woolf, 1991; Medina, et al., 1993; Medina y Reiner, 1994; Marín, et al., 1997). Sin embargo, aunque la presencia de las neuronas colinérgicas en el estriado y el núcleo *accumbens* parece ser una característica común en los tetrápodos, hay diferencias importantes entre las especies en cuanto al número, localización y fisiología de éstas células (Hoogland y Vermeulen-Van der Zee, 1990; Henselmans, et al., 1991; Medina, et al., 1993; Marín, et al., 1997). No obstante la

presencia de neuronas colinérgicas en al menos algunos anfibios implica que ya en tetrápodos primitivos las interacciones dopamina-acetilcolina podrían haber ocurrido en el estriado desde etapas muy tempranas de su desarrollo evolutivo (Reiner, et al., 1998).

En los mamíferos se reconocen al menos tres poblaciones diferentes de neuronas GABAérgicas, que se distinguen basándose en el contenido químico (Wilson, 1998; Reiner, et al., 1998; Kita, 1993; Surmeier, et al., 1988): (1) células GABAérgicas conteniendo parvalbumina; (2) células GABAérgicas conteniendo somatostatina; (3) células GABAérgicas conteniendo óxido nítrico sintetasa y neuropéptido-Y (Kawaguchi, et al., 1995; Figueredo-Cárdenas, et al., 1996), el estriado de anfibios, reptiles y aves también contiene células que son inmunorreactivas a algunas de esas sustancias (Marín, et al., 1998a y b; Reiner, et al., 1998), pero no se sabe si la función de las interneuronas estriatales GABAérgicas es similar a lo observado en los mamíferos, aunque la gran similitud de los circuitos sinápticos estriatales hace suponer que deben ser muy parecidos entre sí (Reiner, et al., 1998). A pesar de la falta de evidencia directa por estudios que apliquen la técnica de doble marcado, es posible decir que los circuitos locales de neuronas estaban ya presentes en el cerebro de tetrápodos antiguos y que el número de las poblaciones de células estriatales parece haber aumentado marcadamente a lo largo de la evolución (Smeets, et al., 2000).

La Transmisión sináptica.

La transmisión sináptica es la principal vía de comunicación en el sistema nervioso, es el mecanismo que se establece entre dos neuronas y a través del cual se transmiten las señales eléctricas de unas células nerviosas a otras (Engelman y MacDermott, 2004) (Fig. 1). El punto en que se transmite la actividad se llama sinapsis (Matthews, 2001) y existen dos clases de sinapsis de acuerdo al tipo de transmisión: las sinapsis eléctricas y la sinapsis químicas.

La Sinapsis eléctrica.

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

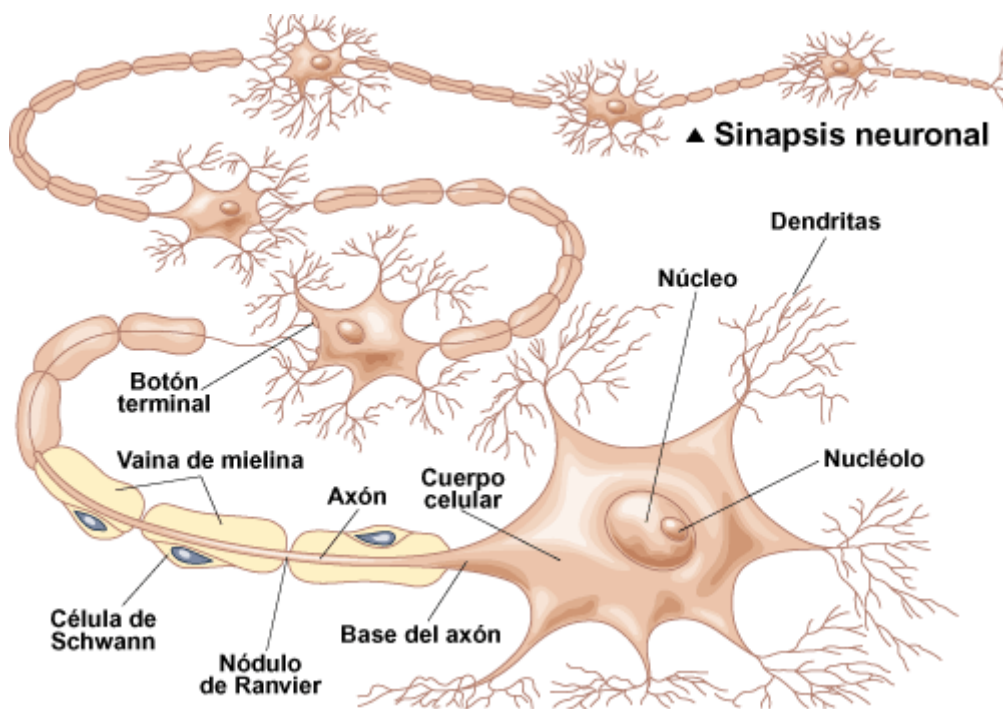


Fig. 1. Sinapsis Neuronal. La sinapsis (del griego. σύναψις, "enlace") es el proceso de comunicación entre neuronas.

La Sinapsis química

En este tipo de sinapsis, las membranas plasmáticas de ambas células están separadas por una hendidura sináptica. Por lo tanto, utilizan una sustancia transmisora con que la neurona presináptica se comunica con la postsináptica (Fig. 2). Es necesaria

la liberación de un transmisor químico por parte de la célula presináptica para que se produzca la transmisión de los impulsos eléctricos. Este tipo de transmisión es más lenta, lo que permite que se adapte a una variedad de funciones y que su actividad sea diversa.

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

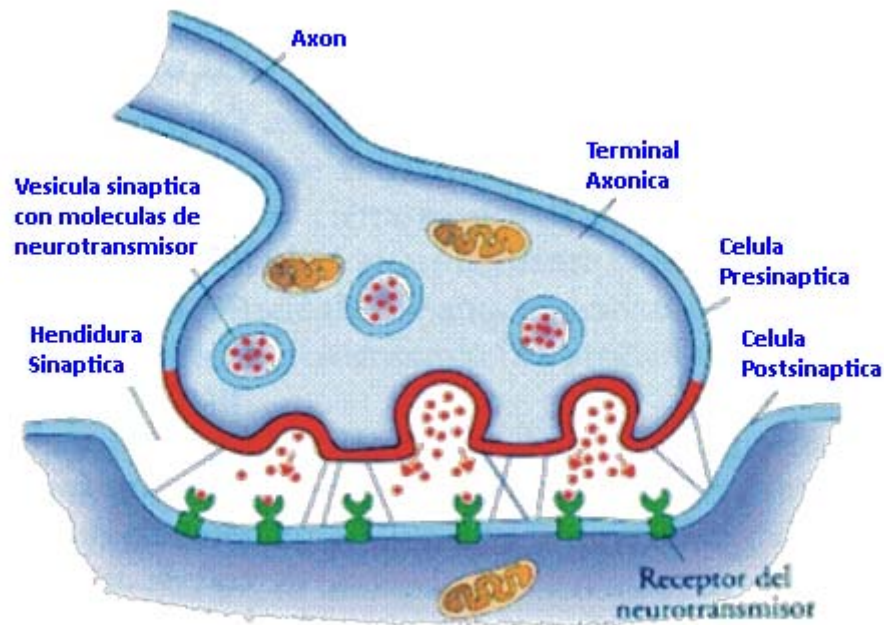


Fig. 2. Sinapsis Química. La sinapsis química se caracteriza por las membranas de las terminales presinápticas y postsinápticas que están engrosadas, y separadas por la hendidura sináptica, el espacio intercelular es de 20-30 nm de ancho. La terminal presináptica se caracteriza por contener mitocondrias y abundantes vesículas sinápticas, que son organelos revestidos de membrana que contienen neurotransmisores.

Neurotransmisores

Los neurotransmisores son sustancias que se liberan en la sinapsis química desde las terminales presinápticas y que afectan a la célula postsináptica (Zimmerman,

1993; Kandel, 2000; Hammond, 2001). Se conoce que en algunas sinapsis muchos transmisores activan no solamente receptores en las células postsinápticas (heterorreceptores), sino que se pueden activar a sí mismas (autorreceptores). La activación de los autorreceptores usualmente modulan la transmisión sináptica limitando la liberación del transmisor (Miller, 1998). Debido a lo anterior se puede decir que un neurotransmisor va ser excitatorio o inhibitorio de la transmisión sináptica dependiendo del tipo de receptores que éste active (Hammond, 2001; Hille, 2001).

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

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

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

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

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

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

Modulación Sináptica.

La modulación es importante para numerosas funciones nerviosas tales como: reflejos espinales, activación sensorial, aprendizaje y memoria, entre otros (Barral, 2001). Esta se lleva a cabo en la terminal sináptica, la cual es un lugar donde se regulan los cambios necesarios para la función sináptica; además, es aquí donde ocurre la

liberación del neurotransmisor, específicamente en la parte presináptica, por lo que la terminal es un sitio donde se regula la misma mediante varios mecanismos o factores (José, 2005); uno de estos mecanismos es través de los canales iónicos (Torres, 2007), ya que estos pueden ser substratos para la fosforilación por diferentes cinasas, defosforilación por fosfatasas, interacción con el ácido araquidónico y sus metabolitos, así como interacción directa con proteínas-G (Barral, 2001; Gohar, 2006) y, aunque estos no son suficientes por sí mismas para producir el disparo en las terminales sinápticas, si producen dramáticos efectos que afectan profundamente el funcionamiento de los canales, y por lo tanto de la neurona (Miller, 1998).

En general, la modulación sináptica contribuye al funcionamiento de la célula en el proceso de la transmisión sináptica, para así tener una conexión sináptica efectiva al determinar la cantidad de neurotransmisor liberado al espacio sináptico, la disponibilidad con la cual éste es liberado, y la respuesta de la célula postsináptica al transmisor. Por otro lado, estos mecanismos moduladores son sitios de numerosas enfermedades de carácter hereditario o adquirido (Barral, 2001).

Modulación Presináptica.

Existen dos tipos de receptores presinápticos: los ionotrópicos (receptor-canal) los cuales dependen de un neurotransmisor y son de acción rápida, y los metabotrópicos (receptor independiente del canal iónico) los cuales están mediados por proteínas G y mecanismos de señalización de segundos mensajeros y son de acción lenta, (Hammond, 2001; Kandel et al., 2000; Hille, 2001). La activación de receptores presinápticos por diversos neurotransmisores y neuromoduladores puede producir inhibición en la liberación de neurotransmisor. La inhibición presináptica puede servir como un medio de ajustar la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación de neurotransmisor. Evidencia previa muestra que los moduladores presinápticos inhiben a los canales de Ca^{2+} y activan canales de potasio en la terminal (Wu y Saggau, 1997; Miller, 1998).

CANALES IÓNICOS.

Los canales iónicos regulan el flujo de iones a través de la membrana en todas las células. En las células nerviosas y musculares los canales iónicos son indispensables para controlar los cambios rápidos en el potencial de membrana, que se asocian con la generación del potencial de acción y de los potenciales postsinápticos de las células blanco (Kandel et al., 2000). Los canales dependientes de voltaje se activan por el cambio en el potencial de membrana, y participan en numerosas funciones celulares importantes, ya que son reguladores cruciales de la excitabilidad neuronal (Dodson y Forsythe, 2004).

La apertura de canales de K^+ generalmente produce una hiperpolarización de la membrana de las neuronas, permitiendo el flujo de potasio hacia el exterior de la célula de acuerdo a su gradiente de concentración; lo que aleja al potencial de la membrana del umbral del disparo, y por lo tanto inhibe la generación de potenciales de acción (Hille, 2001). Por otro lado, la apertura de los canales de Ca^{2+} produce una corriente entrante despolarizante que acerca el potencial de la membrana al umbral de disparo, y por lo tanto aumenta la excitabilidad de la terminal (Hille, 2001; Miller, 1998).

Entre los neuromoduladores que típicamente modulan la liberación de la transmisión sináptica por canales de potasio se encuentran los opiáceos (Johnson y North, 1993). Particularmente en la sinapsis corticoestriatal de la rata se han identificado dos tipos de receptor a péptidos opioides (Jiang y North, 1992), se trata de los receptores Mu (μ) y Delta (δ), los cuales modulan la liberación de glutamato modulando canales de potasio presinápticos (Barral et al., 2003; José et al., 2007).

Los opiáceos endógenos están ampliamente distribuidos y de manera diferencial en el sistema nervioso central (Reisine y Pasternak, 1996). Los opiáceos actúan como neuromoduladores, mostrando una importante influencia en muchos estados fisiológicos y patológicos. En el sistema nervioso los opiáceos endógenos son las endorfinas, las encefalinas y las dinorfinas las cuales son codificadas por tres genes separados (Reisine y Pasternak, 1996).

A la fecha se reconocen como receptores a opiáceos endógenos a los receptores, Mu (μ), Delta (δ) y Kappa (κ), estos receptores metabotrópicos están acoplados a

proteínas-G, ligados directamente a canales iónicos, o bien por mecanismos de segundos mensajeros, por lo que su acción se considera dentro de las sinapsis lentas (Reisine y Brownstein, 1994).

Curiosamente dentro del cerebro de los cordados, la mayor concentración de opiáceos se encuentra en los ganglios basales (Graybiel et al., 1981); los cuales son núcleos subcorticales con neuronas que desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones motoras, el mantenimiento de la postura, así como la planificación, iniciación y ejecución del movimiento (Graybiel, 1990), contribuyendo también a la cognición (Wilson, 2004).

Péptidos Opioides

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

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

Endorfinas

Las endorfinas son originadas de la Proopiomenlanocortina (POMC), una proteína de 267 aminoácidos, de la cual derivan diferentes tipos de endorfinas: α -, β - y γ - endorfina, las cuales se diferencian en la cantidad de aminoácidos. Las β -endorfinas

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

Enkefalinas

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

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

Dinorfinas

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

Receptores a opiáceos

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

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

Receptor μ (Mu)

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

Receptor δ (Delta)

Las met-enkefalinas y leu-enkefalinas son los ligandos endógenos del receptor δ (Hughes et al, 1975). Este receptor es más limitado en su distribución en las áreas sensoriales del cerebro que el receptor μ , está altamente concentrado en la corteza, el estriado, área reticular lateral, por los que se supone que ellos están involucrados en la integración de la información sensoriomotora (Strand, 1999). Se establece que el receptor δ inhibe los niveles de cAMP y modulan la actividad de canales de calcio y potasio dependientes de voltaje (Quock et al, 1999).

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

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

Receptor κ (Kappa)

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

Distribución de los péptidos opioides en el sistema nervioso central.

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

Las drogas opioides (llamados opiáceos) y péptidos endógenos (opioides), han sido relacionadas con diferentes funciones como son: el control del dolor (Jaffe y Martin,

1990), mecanismos de estrés, la regulación respiratoria, el control de la temperatura, el comportamiento sexual, el sistema locomotor, la memoria y el desarrollo de tolerancia y dependencia física.

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

Papel funcional de los receptores a opiáceos

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

La consecuencia de la apertura de canales de potasio es inhibir el disparo celular; tal acción sobre la neurona en la vía de la transmisión del dolor probablemente produce la acción analgésica del opioide. La consecuencia de reducir las corrientes de calcio es menos entendida pero puede incluir inhibición presináptica así como disminuir el efecto directo sobre el metabolismo intracelular tal como la alteración en el estado de fosforilación de una proteína. En ese sentido, los opioides inhiben el disparo de neuronas en muchas regiones del sistema nervioso de mamíferos. La inhibición directa

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

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

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

El efecto de la activación de receptores a opiáceos tipo δ sobre conductancias de K^+ es de interés ya que estas corrientes pueden hiperpolarizar las neuronas haciéndose menos sensibles a los neurotransmisores y regresar al potencial de membrana de reposo después de un disparo (Quock et al, 1999; Barral et al, 2003; Jose et al, 2007).

Las conductancias activadas tanto por el receptor μ (en el *locus coeruleus* de rata) y receptores α (en el plexo submucoso del cobayo) presentan propiedades macroscópicas similares. Ellos muestran rectificación entrante, y son muy sensibles al bario externo. Estas propiedades son similares a esas conductancias de potasio rectificadores entrantes que han sido ampliamente caracterizados en las células del huevo, músculo esquelético, y neuronas (Hille, 1994), excepto que las conductancias son activadas a potenciales menos negativos.

Los rectificadores entrantes no están significativamente abiertos hasta potenciales de membrana próximos al potencial de equilibrio para el potasio (E_K), entonces juegan un importante papel en la célula la cual normalmente tiene un potencial de reposo muy cercano al E_K . Las neuronas en las cuales los opiáceos causan un incremento de largas conductancias normalmente tienen un potencial de reposo alrededor de los -55 a -65 mV, potenciales en los cuales los rectificadores retardados no están significativamente activados. Sin embargo, estos potenciales están cerca del punto medio para la

activación de las conductancias que se abren en presencia de opioides, asegurando que estos agonistas pueden causar una hiperpolarización significativa (Williams et al, 1988).

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

Modulación sináptica por opiáceos

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

El uso de agonistas a receptores δ y μ sobre corrientes postsinápticas excitatorias y propiedades de la membrana en neuronas neocorticales, han mostrado que la activación de receptores a opiáceos μ y δ disminuyen la transmisión excitatoria glutamatérgica provocada en neuronas neocorticales exclusivamente por inhibición presináptica de la liberación de glutamato, mediado probablemente por bloqueo de los canales de calcio presinápticos, aunque también se ha observado una débil activación de conductancias de potasio postsinápticas, pero solamente a altas concentraciones del agonista a opiáceo (Andreas et al, 2000).

Por otro lado, en las terminales axónicas se presenta preferentemente el receptor a opiáceo tipo δ (DOR), sugiriendo un papel primario de estos receptores sobre la modulación de la transmisión sináptica corticoestriatal, mediante la modulación presináptica de la liberación del transmisor. Estas observaciones tienen

importantes implicaciones para la comprensión del papel funcional de los DOR en comportamientos adaptativos y adicción a drogas (Wang y Pickel, 2001). El incremento en las conductancias de K^+ y la disminución de las de Ca^{2+} trae como consecuencia la inhibición del disparo y la reducción de la excitabilidad de la membrana, además de disminuir la liberación del transmisor (North, 1986; North, 1993).

Estudios electrofisiológicos han demostrado que la activación de receptores μ y δ disminuyen la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria por la reducción de la liberación de glutamato y GABA respectivamente de las terminales presinápticas. (Jiang y North, 1992; Schlosser, et al, 1994). En previos trabajos se ha observado que la activación de receptores tipo δ hiperpolarizan algunas neuronas piramidales en la corteza prefrontal como resultado de un incremento en las conductancias de K^+ , al igual que también inhiben presinápticamente la liberación de aminoácidos excitatorios (Tanaka y North 1994), como en otras neuronas de cobayo, plexo submucoso (Mihara y North, 1986); células granulosas del giro dentado de la rata (Piguet y North, 1993).

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

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

OBJETIVOS

General

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

Particulares

- Determinar la modulación presináptica corticoestriatal en los ganglios basales de la tortuga por la activación de receptores a opiáceos tipo μ .
- Demostrar la participación de conductancias de potasio en la modulación presináptica de la sinapsis corticoestriatal de la tortuga.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Si neuromoduladores como los opiáceos podrían estar regulando la entrada de Ca^{2+} , entonces el mecanismo de acción pudiera ser la activación de canales de K^+ .
- Sí los opiáceos modulan presinápticamente en la sinapsis paleoestriatal en tortuga, entonces pudiera deberse a la activación de receptores a opiáceos tipo μ .

JUSTIFICACION

Filogenéticamente el origen de reptiles se remonta a más de 200 millones de años (Northcutt, 1981), En este sentido las tortugas, como otros reptiles, tienen funciones motoras más simples que las de los mamíferos, lo que puede deberse a que presentan una corteza primitiva. Por lo que estudios comparativos de los GB entre mamíferos y

reptiles son de gran importancia ya que ha revelado varias características que son de utilidad para comprender mejor el funcionamiento o disfunción de estas estructuras (Reiner et al, 1998). Este estudio contribuirá a ampliar el conocimiento sobre modulación presináptica producida por opiáceos en la sinapsis de neuronas corticales con neuronas del paleostriatum augmentatum de la tortuga, que es el equivalente anatómico del cuerpo estriado de los mamíferos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron rebanadas coronales de 500 μm de espesor de cerebro de tortuga (*Trachemys scripta elegans*, organismos de 15 a 20 cm), adultos, sin distinción de sexo. Para ello, las tortugas fueron previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (100 mg/kg) y decapitadas, el cerebro fue rápidamente removido y sumergido en una solución salina isotónica (en mM: 96.5 NaCl, 2.6 KCl, 2.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 31.5 NaHCO₃, 10.0 Glucosa) saturada con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. En esta etapa se mantuvieron a una temperatura de 4 ± 1 °C. y un pH 7.4, sin embargo como el cerebro de la tortuga es resistente a la anoxia fue posible realizar registros confiables hasta cinco días después de haber realizado la disección (Muñoz, 1998; José, 2003).

Estimulación y Registro de potenciales de campo.

Las rebanadas obtenidas se colocaron en una cámara de registro a la cual se le hizo pasar una perfusión constante de solución salina 1.0 ± 0.1 ml/min previamente oxigenada, bajo estas condiciones se realizaron todos los experimentos.

Se utilizaron electrodos de estimulación concéntricos bipolares en la punta, el electrodo de estimulación se colocó en la corteza cerebral de la tortuga, mientras que el electrodo de registro se colocó dentro del equivalente al cuerpo estriado (paleostriatum augmentatum), de esta manera se estimularon las fibras corticales aferentes al neostriado. Los estímulos se mandaron por medio de un estimulador controlado por la computadora (Digitimer DS2) en donde se reguló la intensidad (0-25 Volts), la duración (0.01-0.04 ms) y la frecuencia (0.4-0.06 Hz).

Los potenciales de campo fueron registrados mediante microelectrodos de vidrio obtenidos a partir de capilares de vidrio (estirados por calentamiento, de 1.0 mm de diámetro externo), con NaCl al 0.9 % utilizada como medio conductor.

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

Facilitación por pulso pareado.

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

En el presente trabajo se utilizó el paradigma experimental de facilitación por pulsos pareados (FPP), que ha sido utilizada por un sinnúmero de investigadores para estudiar eventos presinápticos (Dunwiddie y Hass, 1985; Mennerick y Zorumski, 1995; Isaacson y Walmsley, 1995; Hernández–Echeagaray, 1998; Barral, 2001).

Para entender el paradigma de la FPP, se han planteado varias hipótesis una de ellas es la inactivación de corrientes de K^+ en la terminal presináptica, lo que provocaría incremento en el influjo de Ca^{2+} extracelular (Andrew y Dudek, 1985). Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco estudiada (Barral et al, 2003; Jose et al, 2007). Quizás, la hipótesis más aceptada sea la del Ca^{2+} residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's. (Katz y Miledi, 1968; Katz y Miledi 1970).

Esta hipótesis, se basa en la afirmación de que la entrada de Ca^{2+} es esencial para la liberación de neurotransmisor. De tal modo que cuando nosotros bloqueamos conductancias de potasio, la concentración de calcio se incrementa en el interior de la célula, debido a que los canales de calcio que se encuentran en la terminal sináptica permanecen más tiempo abiertos (Barral, 2001). Pequeñas modificaciones en la concentración de Ca^{2+} celular bastan para alterar sensiblemente la aparición espontánea de potenciales miniatura, y por lo tanto liberación de neurotransmisor (Del-Castillo y Katz, 1954a; Del Castillo y Katz, 1954b). Por lo tanto, cuando se mandan trenes de estímulos a intervalos cortos de tiempo se observa ya sea un progresivo incremento (facilitación, aumentación o potenciación), o bien, un decremento en la amplitud de las respuestas sinápticas (depresión). Esto quiere decir que grandes cambios en la liberación de neurotransmisor pueden deberse a pequeños cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} seguida de un pulso nervioso (Barral, 2001).

Para producir el protocolo de facilitación por pulso pareado se mandan dos estímulos (S_1 y S_2), cercanos en el tiempo (10-200 ms) (Barral, 2001). La primera respuesta al primer estímulo es el componente S_1 (condicionante) y la segunda S_2

(condicionado) como se muestra en la Fig.3 (Dunwiddie y Hass, 1985; Hernández – Echeagaray, 1998; Barral, 2001).

Protocolo experimental

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

Los experimentos se realizarán en presencia de bicuculina (10 μ M) que es un bloqueador específico del receptor GABA_A, para eliminar el componente inhibitorio y obtener solo el componente glutamatérgico (Bargas, et al, 1998; Barral, 2001; Nisenbaum et al, 1992). En estas condiciones, la intensidad de los estímulos se ajustará para ver poca o ninguna facilitación ($S_2/S_1 \approx 1$) en el tiempo de registro durante el control.

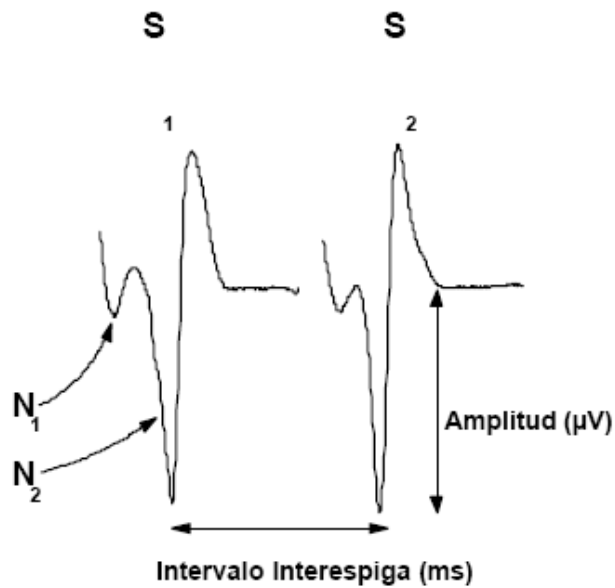


Fig 3. Registro extracelular de un potencial de campo en el estriado de rata. Se pueden observar dos negatividades (N_1 y N_2), la primera es en respuesta al potencial antidrómico que corresponde a la información que va del axón a las dendritas y que aparece aproximadamente de 2 a 4 ms después del artefacto de estimulación. La segunda negatividad corresponde al potencial sináptico que aparecen a los 4 a 8 ms, y se obtiene cuando las aferentes corticales que llegan al árbol dendrítico o al soma de las neuronas estriatales generan un potencial postsináptico (Malenka y Kocsis, 1988). También se muestran dos registros (S_1 y S_2) separados por un intervalo de tiempo, para observar la facilitación por pulso pareado a través del cambio en las amplitudes de la espiga (Tomado de Barral, 2001).

Esto permitirá detectar los cambios provocados por la administración del agonista a los neuromoduladores, así como aquellos cambios provocados por los bloqueadores de potasio, y determinar el cambio en la facilitación la cual se evaluará como el cociente entre la amplitud de la respuesta al segundo estímulo (S_2) entre la respuesta al primer estímulo (S_1):

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

Que expresado en porcentaje queda:

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

Fármacos Utilizados

Para la realización del presente trabajo se hicieron experimentos de oclusión farmacológica utilizando bicuculina (10 μ M).

Para identificar farmacológicamente que tipo de receptores se activan, se empleo un péptido específico al receptor μ . DAMGO (Try-D-Ala-Gly-Me-Phe-Gly-ol) agonista (Jiang y North, 1992); así como un antagonista específicos a este receptor, CTOP (D-Phe-Cys-Try-D-Trp-Om-Thr-Pen-Thr-NH₂). (Dhawan, et al., 1996).

Para determinar si los diferentes agonistas a opiáceos actúan sobre conductancias de potasio en las terminales, se utilizaron antagonistas inespecíficos de esos canales como la tetraetilamonio (TEA) y la 4-aminopiridina (4-AP). (Barral et al, 2003; 2007): Para saber si diferentes agonistas a opiáceos actúan sobre conductancias de calcio en las terminales, se utilizaron toxinas específicas contra los diferentes subtipos de canales de calcio: ω -AgTx-TK para los canales de calcio tipo P/Q (Ca_v 2.1 subunidad α_{1A}) y ω -CgTx-GVIA para los canales tipo N (CAV 2.2, subunidad α_{1B}); que son los que participan en la liberación del transmisor.(Bargas et al.,1998b; Barral et al, 2001). Todos ellos se prepararon en soluciones stock durante el experimento y se disolvieron en la solución salina, se administraron a la preparación a través del dispositivo de perfusión.

Análisis de Datos

La significancia estadística de los cambios observados con el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP), se examinaron en cada experimento con el mismo tejido, siendo su propio control y tomando muestras de datos antes y después de la aplicación de DAMGO y de los diferentes bloqueadores de canales de potasio y calcio.

RESULTADOS

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

Efecto de la activación a Receptores de opiáceos tipo MU

Uno de los agonistas específicos de receptores a opiáceos tipo μ es el DAMGO (Jiang y North, 1991; Barral et al, 2003). En la figura 4 se muestra el registro electrofisiológico obtenidos después de la aplicación de DAMGO (1 μ M) en la sinapsis corticoestriatal de la tortuga; de la misma manera se hicieron experimentos a diferentes concentraciones (3 μ M, 300 nM, 100 nM, 30 nM y 10 nM), con la finalidad de hacer una curva dosis respuesta, como se verá más adelante. En la Figura 4 Se muestra el curso temporal, del un experimento típico, en el panel A se muestra en la parte superior la FPP, como el cociente S2/S1. En la porción inferior se muestran las amplitudes de la primera (S1) y la segunda (S2) respuesta. En el panel B se muestran los registros electrofisiológicos indicados en el panel A, en este caso se puede observar que la respuesta sináptica S2 aumenta su amplitud después de la aplicación de DAMGO, mientras que el cambio en la respuesta S1 es menor, lo cual nos indica que existe una facilitación por pulso pareado, ya que paso de 1.141 ± 0.203 a 3.5 ± 0.937 (Mediana de 1.090 a 2.403, $n = 9$, $P < 0.01$, prueba de Wilcoxon). Sin embargo, como el calcio es el principal ión involucrado en la liberación de neurotransmisores, entonces la activación o el bloqueo de canales de K^+ pueden regular la entrada de Ca^{2+} presináptico, porque el bloqueo de canales de potasio hace que la terminal permanezca más tiempo despolarizada después de la llegada de un estímulo, lo que permite una mayor entrada de calcio por los canales de calcio dependientes de voltaje, y por lo tanto una mayor liberación (Miller, 1998). Cuando se aplica el protocolo de FPP, lo que se observa es una

depresión por pulso pareado, ya que la respuesta S1 aumenta, mientras que la respuesta S2 disminuye (Barral et al, 2001).

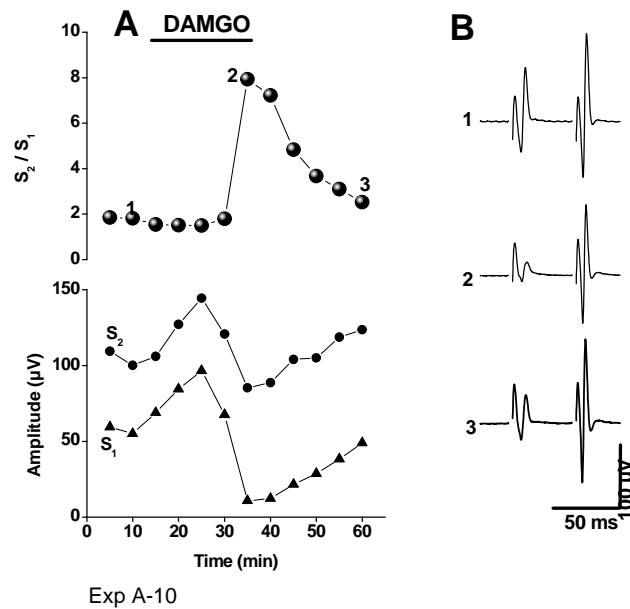


Fig. 4. Modulación Presináptica producida por el agonista DAMGO. En A se muestra el curso temporal del experimento, la aplicación de $1\mu M$ de DAMGO, aumenta la facilitación por pulso pareado. En B se observa la modificación de S1 y S2 hay una amplitud considerable, esto indica que hay una facilitación por pulso pareado.

Mientras que la activación de los canales de potasio incrementa la repolarización después de un estímulo, lo que se observa es una disminución en la entrada de calcio a la terminal y por lo tanto una menor liberación. Utilizando el protocolo de FPP se observa un incremento mayor en la respuesta S2 con respecto a la S1, por lo que dice que hubo una facilitación por pulso pareado (Barral et al, 2001). Estos resultados nos indican que el mecanismo de acción por opiáceos tipo μ es la activación de canales de K^+ en la sinapsis corticoestriatal de la tortuga.

Especificidad de los receptores a opiáceos tipo μ

Para demostrar que los receptores a opiáceos tienen efectos inhibitorios como se ha reportado anteriormente, en el presente trabajo se muestra que la activación de los receptores a opiáceos en este caso los receptores tipo μ juegan un importante papel en la modulación presináptica paleoestriatal. Al aplicar al medio extracelular el DAMGO ($1 \mu\text{M}$) se observa un aumento en la facilitación por pulso pareado, lo que refleja una disminución en la liberación del transmisor glutamato. Se utilizó CTOP como antagonista y el DAMGO como agonista, de los receptores a opiáceos tipo μ . En la figura 5 se ilustra el curso temporal de un experimento en el cual se observa el cambio en la FPP producida en primer término por el efecto del CTOP (1 mM), entre las amplitudes S_2/S_1 hay una disminución en la FPP. Sin embargo cuando se lava el CTOP del medio extracelular y se aplica el DAMGO ($1 \mu\text{M}$) se observa un aumento en la FPP. Posteriormente se lava el CTOP y el DAMGO dejando 20 minutos de recuperación y nuevamente aplicando el agonista se observa un incremento de la amplitud de S_2 .

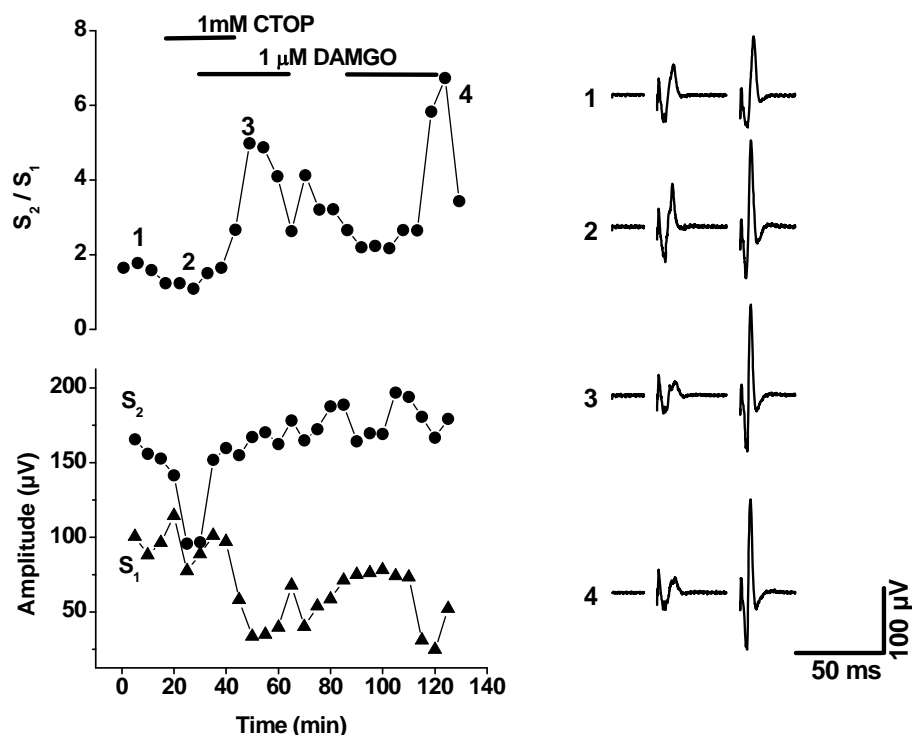


Fig. 5. Efecto del Agonista DAMGO en presencia del antagonista CTOP. En presencia del CTOP el agonista sigue teniendo efecto, esto nos indica que no se bloquea el efecto del DAMGO.

CURVA DOSIS-RESPUESTA

Haciendo experimentos a diferentes concentraciones de DAMGO (n=28) se observó que neuromoduladores como los opiáceos pueden regular la liberación por la acción de canales de K^+ . Como se puede apreciar en la figura 4, el efecto que obtuvimos con el agonista fue un incremento sobre la facilitación por pulso pareado, la activación de receptores μ , siendo una dosis-dependiente. Estos datos nos indican que la modulación de la liberación de neurotransmisor, en este caso, es dependiente de la concentración utilizada. La activación de receptores presinápticos por diversos neurotransmisores y neuromoduladores puede producir inhibición en la liberación de neurotransmisor. La inhibición presináptica puede servir como un medio de ajustar la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación de neurotransmisor. Existe evidencia previa que muestra que los moduladores presinápticos inhiben a los canales de Ca^{2+} y activan canales de potasio en la terminal (Jiang y North, 1991; Wu y Saggau, 1997; Miller, 1998, Barral et al, 2003; José et al, 2007).

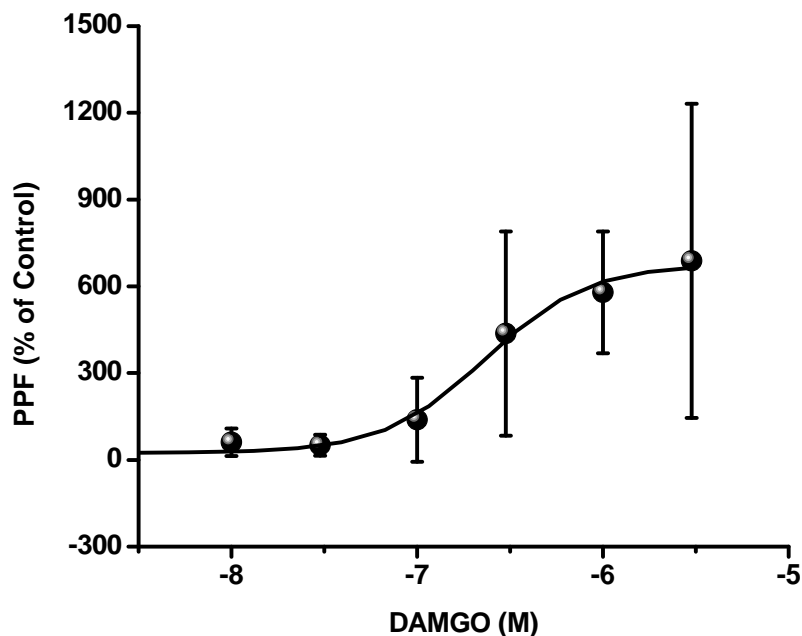


Figura 6. La respuesta del receptor μ es dependiente de la concentración. La aplicación de DAMGO a diferentes concentraciones produjo un incremento en la facilitación por pulso pareado (FPP) mostrando un efecto de inhibición presináptica dependiente de la concentración utilizada.

Modulación Presináptica de Opioides tipo Mu por canales de Calcio

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

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

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

Canales de Ca²⁺

Los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CCDV) han sido clasificados de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en cinco tipos esenciales denominados T, L, N, P/Q y R. Los canales T son activados a potenciales cercanos al potencial de membrana (típicamente a potenciales más negativos de -50 mV); los canales restantes requieren mayores voltajes de activación (Catterall, 1998). Típicamente los canales N y P/Q se colocan junto a las series de vesículas ancladas en la sinapsis donde controlan la liberación, esto puede ser demostrado por la

sensibilidad de varios tipos de neurotransmisores a bloqueadores específicos de esos canales (Miller, 1998; Wu y Saggau, 1997; Barral et al, 2001). Los canales R han sido los menos caracterizados debido a su insensibilidad a bloqueo farmacológico. Los canales más abundantes son los canales L, particularmente en las células musculares tanto esqueléticas como cardíacas donde juegan un papel esencial en el mecanismo de acople excitación-contracción, aunque también están presentes en las terminales nerviosas (Catterall, 1998; Hammond, et al., 2001; Wu y Saggau, 1997), al parecer no participan en la liberación de neurotransmisores (Barral et al, 2001).

El papel del Ca^{2+} en la liberación

La liberación de neurotransmisor de vesículas sinápticas es inducida por el influjo de Ca^{2+} en los canales de calcio dependientes de voltaje (Fassio, et al., 1996), y la rapidez de esta respuesta recae en la estrecha proximidad de los sitios en los cuales la exocitosis ocurre y los sitios de influjo de Ca^{2+} . En condiciones de reposo la concentración intracelular de Ca^{2+} libre no es mayor de 10^{-7} o 10^{-8} M, que es al menos 10,000 veces menor que la concentración de Ca^{2+} extracelular (Penner, et al., 1993; Hammond, 1996). La despolarización producida por la llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica, provoca un cambio en la concentración interna de Ca^{2+} , ya sea por la entrada de Ca^{2+} extracelular debida a la activación de los CCDV (Wheeler, et al., 1994a y b; Barral et al., 2001) o por la liberación de Ca^{2+} de sitios de almacenamiento intracelulares (Meldolesi, et al., 1988). La entrada de Ca^{2+} extracelular a través de CCDV (Canales de calcio dependientes de voltaje) es necesaria para producir la exocitosis de neurotransmisor (Flores-Hernández, et al., 1997; Zimmerman, 1993), el número de iones de Ca^{2+} que entran por unidad de tiempo depende de: a) el número de canales de Ca^{2+} abiertos, los cuales dependen de la actividad presináptica, b) el número de canales de Ca^{2+} susceptibles de activación y c) la activación de canales de K^+ (Hammond, 2001). No todos los canales de Ca^{2+} están asociados a la liberación de neurotransmisor, por ejemplo en la sinapsis cortico-estriatal los canales L y T no participan directamente o su participación no es significativa (Bargas, et al., 1998; Barral, et al., 2001), sin embargo los canales L son susceptibles de ser modulados por diversos fármacos (Barral, et al., 2001). La modulación presináptica debido a la

activación de los receptores GABA_B involucra proteínas G que señalizan e inhiben presinápticamente a los canales de Ca²⁺, lo que provoca una reducción en la liberación de neurotransmisores (Misgeld, et al., 1995; Wu y Saggau, 1997; Barral, et al., 2000; Sánchez Mejorada, 2009), además de que se ha propuesto que la activación de receptores GABA_B presinápticos inhibe la entrada de Ca²⁺ extracelular modulando los canales de calcio dependientes de voltaje (Chen y Van-den-Pol, 1998; Hirata, et al., 1995; Takahashi, et al., 1998, Barral et al, 2000; Sánchez Mejorada, 2009).

Efecto de ω -CgTx-GVI

Los canales de Ca²⁺ tipo N están presentes a nivel presináptico en las terminales nerviosas corticostriatales de la tortuga al igual que en los mamíferos. (Sanchez-Mejorada. 2009, Barral et al, 2000). Para el bloqueo de los canales de Ca²⁺ tipo N se utilizó ω - CgTx GVIA, que produjo una inhibición presináptica, así como un incremento en la FPP después de ajustar el voltaje, ya que paso de 1.349 ± 0.138 a 1.734 ± 0.142 (mediana cambio de 1.266 a 1.718, n=12, P < 0.05, Prueba de Wilcoxon) confirmando la presencia de estos canales en las terminales corticostriatales de la tortuga (Fig. 7). Se puede observar que después de la aplicación del DAMGO, agonista de los receptores Mu (1 μ M), en presencia de ω - CgTx GVIA, el agonista Mu continua produciendo facilitación por pulso pareado ya que paso de 1.940 ± 0.355 a 2.124 ± 0.142 (Mediana cambio de 0.970 a 2.187, n=6, NS, Prueba de Wilcoxon). Claramente se puede observar un incremento en la respuesta al segundo estímulo (S2) en presencia del bloqueador del canales N y en presencia del DAMGO.

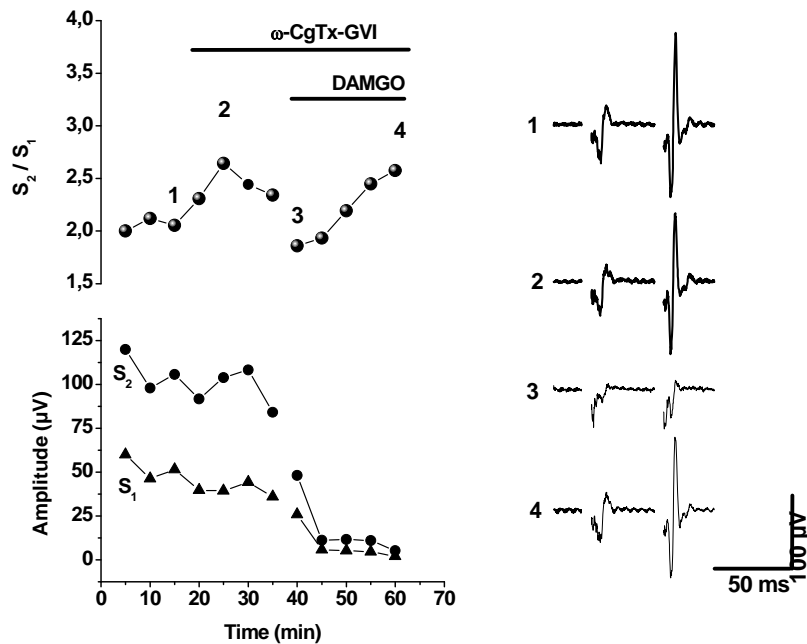


Fig 7 El efecto del bloqueador de canales de calcio con ω -CgTx-GVI (1 μM). Se puede observar que aun después de bloquear los canales de calcio, el DAMGO sigue teniendo efecto. Observe el registro número 4 se observa que la amplitud de la respuesta S_2 es mayor que la respuesta sináptica S_1 después de haber aplicado el bloqueador de canales de calcio y en presencia del DAMGO.

Cuando se agregó el DAMGO (1 μM) en presencia del bloqueador de canales de calcio tipos P/Q, se observó que el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q no ocluyó el efecto del DAMGO, en la Figura 8 se muestra la aplicación del bloqueador específico (ω -AgTx TK) no impide que la aplicación del agonista DAMGO produzca un incremento en la FPP, ya que paso de 2.098 ± 0.230 a 2.922 ± 0.513 (mediana cambio de 1.480 a 3.484, $n=5$, NS, Prueba de Wilcoxon), lo que sugiere que los canales de calcio tipos P/Q tampoco participan en esta modulación como se ha sugerido para mamíferos (Barral et al, 2003; José et al, 2007).

Efecto de ω -AgTx TK

Una de las finalidades de este trabajo fue la de evidenciar la presencia de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en terminales nerviosas de la tortuga. La aplicación de ω -AgTx TK (400 nM) produjo un incremento en la FPP, ya que paso de 1.748 ± 0.314 a 2.243 ± 0.206 (mediana cambio de 1.879 a 2.262, $n=9$, $P < 0.05$, Prueba de Wilcoxon), lo que sugiere la presencia de estos canales en las terminales corticostriatales de la tortuga.

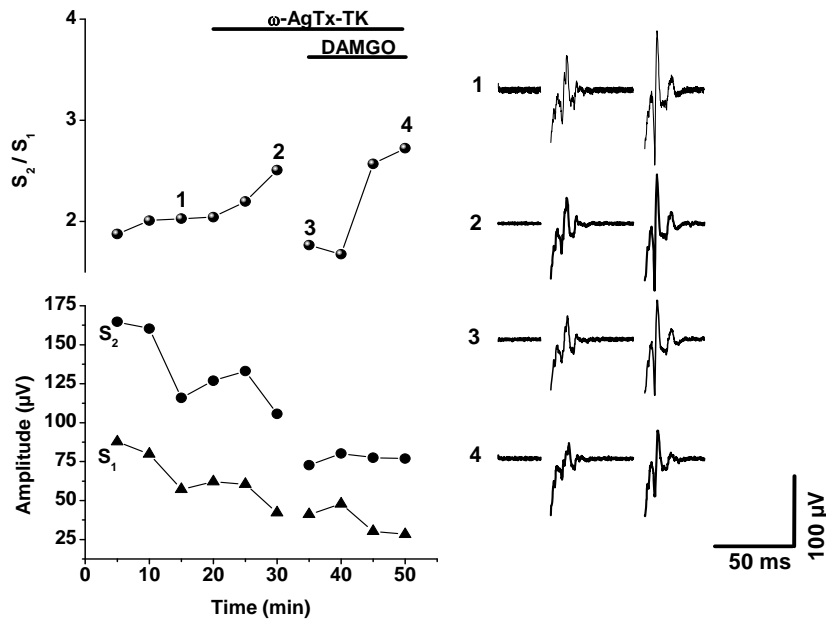


Fig 8. Efecto del bloqueador de canales de calcio con ω -AgTx-TK . Se puede observar que aun después de bloquear los canales de calcio, con Agatoxina no ocluye el efecto del DAMGO. Al agregar la ω -Agatoxina TK se observa un cambio en la facilitación, y en las amplitudes, pero al agregar DAMGO se observa un incremento mayor de la facilitación, lo que sugiere que el papel de los canales P/Q en la modulación corticostriatal de la tortuga no es muy marcada.

Módulación Presináptica de Opiáceos tipo MU por Canales de Potasio

Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que bloqueadores de canales de potasio incrementan la liberación del transmisor alargando la duración de potenciales de acción presinápticos, indicando que los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V) en la terminal nerviosa participan en la regulación de la liberación del transmisor (Katz y Miledi, 1969; Augustine, 1990, Barral et al, 2003; José et al, 2007). Por ejemplo los canales de K_V en la terminal nerviosa también pueden mediar modulación sináptica a través de señales moleculares y drogas (Ishikawa et al, 2003). La modulación presináptica por canales de potasio consiste en activar conductancias de potasio, a través de receptores acoplados a proteínas-G (Mitz et al, 1995). Al incrementar la conductancia del ión K^+ se disminuye la duración y amplitud del potencial de acción en la terminal sináptica. Por lo tanto la despolarización en la terminal es menos efectiva, ya que los canales de Ca^{2+} permanecen menos tiempo abiertos y en consecuencia una menor cantidad de neurotransmisor es liberado (Graham y Redman, 1994). En ese sentido Robitaille y colaboradores (1993) observaron que en la terminal motora de anfibio los canales de potasio tipo BK_{Ca} son activados durante la entrada de calcio lo que los llevo a pensar que estos canales se encuentran cerca de los canales de calcio pudiendo regular la liberación del transmisor.

CANALES DE POTASIO.

Los canales de K^+ permiten el flujo de potasio y son esenciales para la generación de la corriente eléctrica a través de las membranas (Choe, 2002). Son reguladores fundamentales de la excitabilidad ya que coloca potenciales de membrana de reposo y disparos de umbral, repolarizan potenciales de acción y limitan la excitabilidad (Dodson y Forsythe, 2004). Además, controlan la frecuencia y la forma del potencial de acción, la secreción de hormonas y neurotransmisores y el potencial de membrana de la célula. Sus actividades son reguladas por un número de factores que incluyen los potenciales a través de la membrana celular, calcio citosólico y ATP, la acción de varias

cinasas, fosfatasas y segundos mensajeros movilizados por neurotransmisores y hormonas (Miller, 1995; Alexander et al., 2004).

Modulación de los Canales de Potasio.

Es bien aceptado que la actividad de los canales iónicos es modulada por la acción de las proteínas quinasas unidas a sistemas de segundos mensajeros. Tal modulación de los canales iónicos permite a una neurona modificar su patrón de disparo y su respuesta a entradas sinápticas sobre el tiempo y, en muchos casos, es sabido que refuerza cambios prolongados en la conducta del animal (Jonas y Kaczmarek, 1996).

La determinación de tipo de canales de potasio que se encuentran participando, en la modulación de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis corticales de la tortuga, de las aferentes glutamatérgicas. En este caso se utilizaron antagonistas no específicos de los canales de K^+ . TEA (20mM) 4-AP (1mM) utilizando experimentos de oclusión farmacológica de estos canales.

Debido a que los bloqueadores no son específicos, nos basamos en la sensibilidad de los canales de K^+ . En algunos de los casos se utilizaron diferentes concentraciones para ver la respuesta de los diferentes agentes bloqueadores.

Efecto del TEA

El clásico bloqueador de canales de potasio es el Tetraetilamonio (TEA), es usado ampliamente como una molécula externa o interna que obstruye la boca del poro de los canales de potasio dependientes de voltaje, no dejando pasar iones potasio a través del poro (Heginbotham y MacKinnon, 1992; Crouzy et al., 2001). Muchas de las conductancias de potasio son bloqueadas por este bloqueador no específico de canales de potasio TEA (Faber y Sah, 2000; Xu, et al, 2001; Tan y Llano, 1999). Los canales de potasio sensibles a TEA entran en dos categorías; cuando actúa externamente; los que son altamente sensibles ($K_i < 1$ mM; Hille, 1967) y los que son relativamente insensibles ($K_i > 20$ mM; Armstrong y Binstock, 1965). También se ha

visto que el efecto del agente bloqueador TEA difiere cuando se aplica internamente ó externamente pues se han sugerido dos sitios de unión (Armstrong y Hille, 1972; Hille, 1992), su aplicación externa bloquea algunas pero no todas las corrientes de potasio (Stanfield, 1983), su aplicación interna es menos específica y usualmente menos potente. El TEA puede activar tanto extracelular como intracelularmente, se sabe que a altas concentraciones bloquea casi todas las conductancias de los canales de K^+ . (Hille 2001)

Para determinar sí en las terminales sinápticas glutamatérgicas que llegan al estriado de la tortuga se encuentran participando los canales de potasio utilizamos TEA. Este bloqueador se sabe que a altas concentraciones bloquea casi todas las conductancias de los canales de potasio (Hille, 2001). En la figura 9 observamos el curso temporal de la aplicación de Tetraetilamonio, la barra nos indica el tiempo de exposición al agente bloqueador (TEA 20 mM). Los números nos indican puntos del experimento que fueron tomados para ser representados en B, en este experimento representativo se observa el cambio de las amplitudes S_2/S_1 a través del tiempo de exposición al agente bloqueador con respecto a los controles, este agente tuvo su efecto máximo 40 minutos después de su aplicación observándose una disminución de la facilitación por pulso pareado de 46.52 %, ya que la FPP cambio de 1.670 ± 0.209 a 0.777 ± 0.208 (Mediana de 1.590 a 0.663, $n = 7$ ($p < 0.05$; prueba de Wilcoxon).

Después de haber obtenido el efecto máximo del TEA sin ningún cambio en la FPP se aplico el DAMGO ($1 \mu M$) al medio extracelular y lo que se observo fue que la acción del DAMGO ($1 \mu M$) se ve ocluida después del efecto producido por el TEA (20 mM). En la figura 9 se observa que el efecto del DAMGO sobre la FPP se vio completamente bloqueado ya que solo produjo un cambio en la FPP = 0.9 %, ya que cambio de 0.777 ± 0.208 a 0.770 ± 0.143 (mediana de 663 a 421.; $n = 7$, NS Prueba de Wilcoxon). Estos resultados nos indican que el bloqueo de la mayoría de las conductancias de potasio en presencia de TEA (20 mM) ocluyen la acción del DAMGO y que por lo tanto el efecto inhibitorio producido por la activación de los receptores a opiáceos tipo Mu sobre las aferentes corticoestriatales de la tortuga posiblemente sea a través de la activación de algunas conductancias de potasio sensibles a esta concentración de TEA (20 mM).

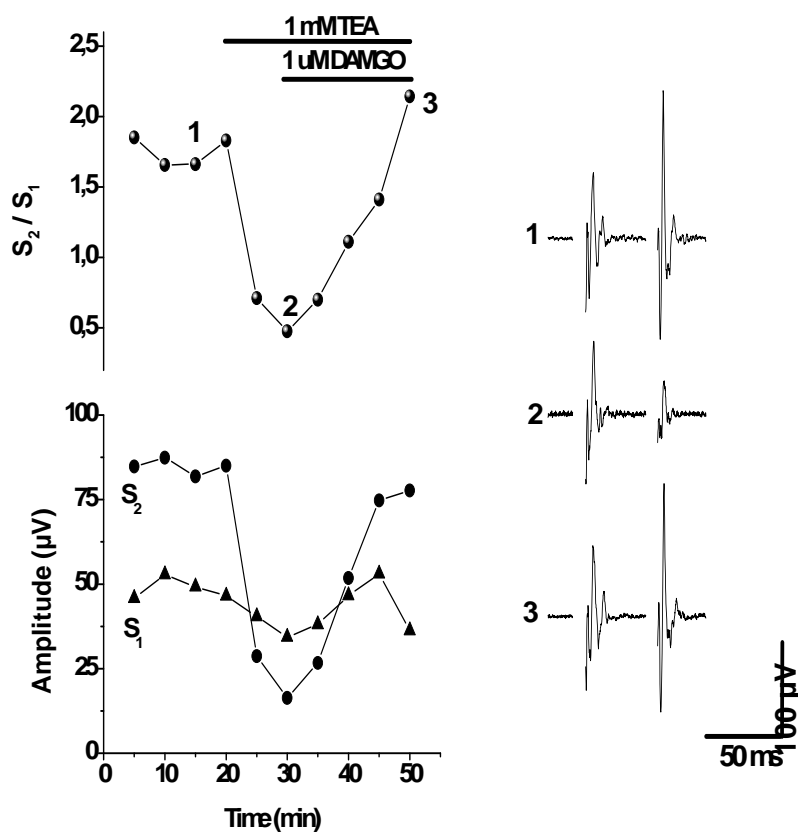


Fig 9. Efecto del Bloqueador TEA (1mM). Para determinar si los diferentes tipos de canales de potasio participan en la modulación de la liberación del neurotransmisor en la sinápsis cortico-estriatal de tortuga se ocuparon antagonistas no específicos: Tetraetilamonio. En E Curso temporal de la aplicación TEA, La barra nos indica el tiempo de exposición al bloqueador, se observa que el Tetraetilamonio produce depresión por pulso pareado. Los números nos indican puntos que fueron tomados para ser representados en el panel B

Efecto de la 4-aminopiridina

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

En la Figura 10 se observa que la relación de las amplitudes (S_2/S_1) disminuye después de aplicar al medio extracelular 4-AP (1 mM). En condiciones control, para esta serie de experimentos se obtuvo una FPP = 1.740 ± 0.317 , sin embargo la FPP tiende a disminuir rápidamente después de haber bloqueado las conductancias del K^+ con 4-AP (FPP= 0.385 ± 0.138). En la figura 10C podemos observar los registros extracelulares de este experimento en el que se representa el cambio en la FPP en relación a las amplitudes de las dos respuestas sinápticas evocadas. Después de aplicar el 4-AP (1 mM) se observa que las amplitudes cambian, y por consiguiente el cociente entre la amplitud S_2/S_1 tiende a disminuir por lo que nuestros resultados muestran que el bloqueo de las conductancias de potasio por 4-AP (1 mM) produjo una disminución en la FPP = $-293.65 \pm 118.89\%$ (mediana = -171.189 ; $n = 8$; $P < 0.01$, Prueba de Wilcoxon). Cuando ya no se observo cambio en la FPP producida por el efecto de 4-AP se aplico DAMGO (1 μ M) al medio extracelular. El efecto del DAMGO se ve OCLUIDO en presencia de 4-AP ya que se el cambio que se observa en la FPP es $-1.161 \pm 8.421 \%$; (mediana = 2.869% ; NS, Prueba de Wilcoxon), Finalmente al quitar el DAMGO y el 4-AP de la perfusión se puede apreciar una recuperación parcial de la respuesta (Fig. 10).

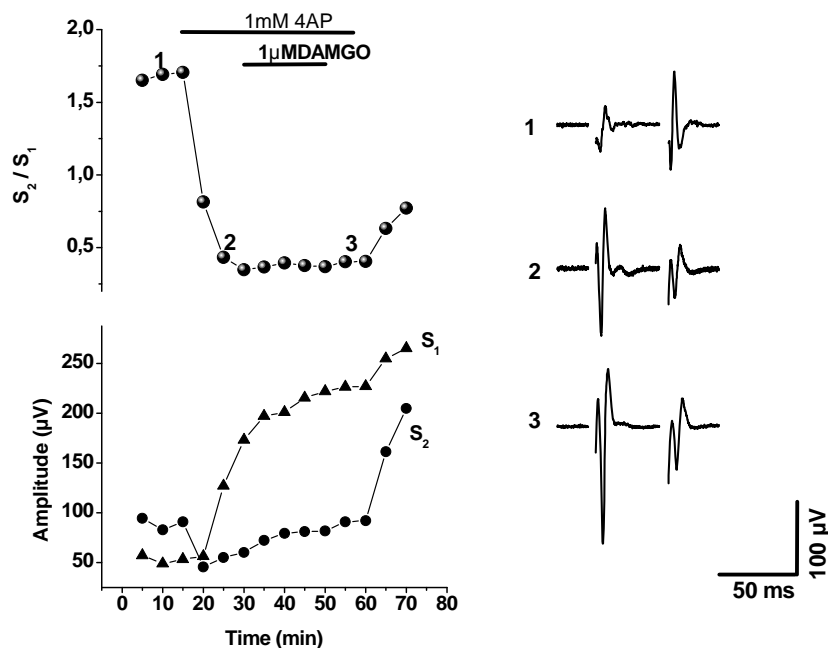


Fig. 10. Efecto de DAMGO en presencia de 4-AP. Al aplicar 4-AP a una concentración 1mM, ésta produce una depresión por pulso pareado. Cuando se aplica el DAMGO (1µM) en presencia de la 4-AP se observa que la facilitación producida por el opiáceo se ve ocluida por el bloqueo de los canales de potasio.

DISCUSIÓN

El propósito fundamental de este trabajo consistió en determinar si la activación de receptores a opiáceos tipo μ produce cambios en la modulación presináptica, asimismo, nos interesa conocer si la modulación por opiáceos estaba actuando a través de canales de potasio en la sinapsis cortico-estriatal de la tortuga. Los datos que se muestran en esta investigación, parecen confirmar que la modulación presináptica producida por la activación de receptores a opiáceos disminuye la liberación de glutamato en la sinapsis cortico-estriatal de la tortuga actuando a través de los canales de potasio. Sin embargo los alcances de la pregunta evolutiva van más lejos, como se verá más adelante.

Nuestros resultados mostraron que cuando se bloquean los canales de K^+ se observa una disminución en la FPP, lo que nos indica que ocurre una mayor liberación del Glutamato en esta sinapsis, debido a la presencia de canales de potasio en las

terminales corticoestriatales de la tortuga. Estudios previos en mamíferos, han señalado que la activación de receptores a opiáceos μ y δ producen inhibición presináptica o disminución de la liberación de glutamato en las sinapsis corticoestriatales (Jiang y North, 1992, Barral et al, 2003; José et al, 2007)

En general no se encontraron diferencias significativas en la modulación presináptica producida por receptores a opiáceos tipo MU entre la sinapsis cortico-estriatal de reptiles (tortuga) y la de mamíferos (rata), ya que tanto los agonistas como los antagonistas tienen efectos similares en la tortuga así como en las ratas. Tampoco encontramos diferencias respecto a los tipos de canales de Ca^{2+} que están presentes, sin embargo estudios recientes han mostrado que la modulación presináptica por canales de calcio en estas dos clases de cordados es diferente, ya que la modulación presináptica en las ratas adultas ocurre por mediación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Barral, et al., 2000), mientras que en los reptiles esta modulación se debe a canales de Ca^{2+} tipo N (Sánchez-Mejorada, 2009). La modulación por canales de Ca^{2+} tipo N no es ajena a las ratas, ya que en las ratas jóvenes se da esta modulación (Salgado, et al., 2005), pero a medida de que tanto el desarrollo neuronal, así como el crecimiento en general de la rata continúan, el número de canales de Ca^{2+} tipo N modulando va decreciendo, mientras que el número de canales P/Q va aumentando, hasta que se llega a un punto en donde los canales P/Q son los que dominan, y son los encargados de la modulación (Salgado, et al., 2005)

Por otra parte, nuestro trabajo trata de la modulación presináptica producida por opiáceos en la sinapsis cortico-estriatal de la tortuga. En ésta al igual que en mamíferos, los canales de calcio no parecen estar involucrados. Como ya se menciono los receptores opioides están involucrados en numerosos procesos fisiológicos, y los más comunes incluyen la transmisión del dolor así como los mecanismos de recompensa, sin embargo el proceso evolutivo de los receptores de opiáceos hasta ahora ha sido poco estudiado en los tetrápodos. (Dreborg 2008)

Hasta donde sabemos, hace unos 400 millones de años se originaron los cordados, que han evolucionado en diferentes etapas; cada una de ellas caracterizada por auges o radiaciones adaptativas que han producido nuevos grupos de organismos (Northcut, 1981, Pough et al, 1999, Rommer, 1973). En términos generales se reconocen al menos cuatro radiaciones adaptativas (o cladas). La primera de éstas

permitió el surgimiento de los agnatos, que son representados actualmente por los ciclóstomos (lampreas) y los mixínidos. Se cree que se originaron a partir de los ostracodermos, organismos protegidos por fuertes placas óseas. Los ciclóstomos actuales representan una radiación separada y paralela que se separa muy tempranamente del árbol evolutivo de los demás vertebrados (Northcutt, 1981).

A partir de los agnatos, surgen los gnatostomados, que se caracterizan por poseer mandíbulas fuertemente armadas (Alvarez-del-Villar, 1977, Rommer, 1973). Los gnatostomados ancestrales rápidamente evolucionaron en tres distintos grupos: Placodermos, condriicties y osteictios, los tres grupos poseen mandíbulas, con lo que se incrementa la eficiencia alimentaria, así como aletas pareadas, con lo que se incrementa la estabilidad locomotora y la maniobrabilidad. Estos desarrollos marcan la evolución de nuevos y más activos vertebrados depredadores (Alvarez-del-Villar, 1977, Northcutt, 1981, Rommer, 1973), siendo probablemente esta época, y la aparición de nuevos hábitos entre los diferentes grupos de cordados, la que marque la aparición de los receptores a opiáceos en el sistema nervioso (Dreborg 2008).

Hace unos 200 millones de años se originaron los reptiles a partir de un grupo de anfibios, probablemente los laberintodontos (Alvarez-del-Villar, 1977, Northcutt, 1981, Rommer, 1973). Lo que marca la emergencia de los vertebrados completamente terrestres y la evolución de los tetrapodos. Esto fue posible por la evolución del huevo amniótico, que hace innecesario pasar por estados larvales acuáticos. La transición del medio ambiente acuático al medio ambiente terrestre implicó grandes cambios en la organización estructural y funcional de los organismos, particularmente del sistema nervioso. Casi inmediatamente después de su origen, los reptiles se dividieron en varios grupos principales, de los que sobresalen los sauropsidos, de los que surgen los principales grupos de reptiles y aves actuales; y los terapsidos, a partir de los cuales se originaron los modernos mamíferos (Alvarez-del-Villar, 1977, Northcutt, 1981, Pough et al, 1999, Rommer, 1973).

Si consideramos que el plan básico del sistema nervioso central de todos los vertebrados presenta una organización estructural común, que se aprecia mejor en los estadios embrionarios (de amniotas) y en los adultos de las especies más primitivas (anamniotas). Entonces el cerebro es básicamente una estructura tripartita: en su forma más simple el cerebro anterior está relacionado con el sentido del olfato, el

cerebro medio con la visión, mientras que el cerebro posterior con el equilibrio y detección de la vibración. Esas porciones del cerebro están asociadas con las cápsulas nasal, óptica y ótica del condocráneo (Pough et al, 1999, Sarnat y Netsky, 1976). Durante el desarrollo, el cerebro se origina del tubo neural, a partir de la cual se originan tres vesículas principales: El Rombencéfalo, que posteriormente se diferencia en Mielencéfalo y Metencéfalo (médula oblonga, puente y cerebelo); el Mesencéfalo (encéfalo medio) y el Proencéfalo, que posteriormente se diferencia en Diencéfalo (tálamo, epitálamo, hipotálamo y subtálamo) y Telencéfalo (hemisferios cerebrales, sistema olfatorio, ganglios basales) (Carpenter, 1976, Northcutt, 1981, Pough et al, 1999). Las teorías tradicionales de la evolución del telencéfalo sugieren que en los primeros vertebrados (Agnatos), los hemisferios cerebrales consistían únicamente de componentes olfatorios (Sarnat y Netsky, 1976).

En estudios realizados en vertebrados, han mostrado que los receptores a opiáceos μ , δ , y κ , están presentes en la mayoría de la especies, sin embargo esto nos indica que muy probablemente no han habido grandes cambios evolutivos de los receptores a opiáceos, ya que se dice que desde un punto de vista filogenético es probable que este tipo de receptores estén presentes desde el origen de los primeros mandibulados (Dreborg 2008).

En ese sentido es importante mencionar que desde su aparición, los receptores a opiáceos tienen sus regiones altamente conservadas (Herrero 2008; Li 1996), en especial los receptores que están ligados a la morfina, y que son los receptores tipo μ , esto es muy interesante, ya que este tipo de receptores se ha asociado con sitios de actividad altamente adictiva, lo que le confiere una importancia clínica. Además que se considera que los receptores μ están presentes desde las primeras etapas de la evolución de los vertebrados. (Li 1996)

Podemos mencionar que la evolución de los opiáceos funcionalmente ha sido conservada molecularmente (Herrero 2008), sin embargo a lo largo de la evolución ha sufrido un reordenamiento cromosómico, basado en una combinación de secuencia basada en la filogenia y la localización cromosómica de los genes (Stevens 2007; Larhammar 2009)

En los GB los opiáceos parecen desempeñar un papel importante en la regulación de las funciones motoras (Bargas et al, 1998, Mink, 1996). La mayor parte

de nuestro conocimiento que involucra a los GB con funciones motoras se basa en el estudio de desordenes con patologías como las enfermedades de Parkinson y Huntington, así como modelos en animales que simulan estas enfermedades. Es generalmente aceptado que los GB están involucrados en una variedad de funciones no-motoras, que incluyen aquellas relacionadas a conductas incentivas y motivacionales (Graybiel, 1990).

Estudios de las dos últimas décadas han llevado a la conclusión de que existen numerosas similitudes en la organización de los GB de vertebrados amnióticos (reptiles, pájaros y mamíferos). Lo que hace pensar que esta organización ya estaba presente en los antepasados de este tipo de animales (Marín et al, 1998, Reiner et al, 1998, Reiner et al, 1984). Del mismo modo se ha señalado que deben existir diferencias mayores en la organización de los GB entre los amniotas y anamniotas actuales (peces y anfibios), sugiriendo que el desarrollo de los GB como lo observamos en los organismos actuales se llevó a cabo en la transición evolutiva de anamniotas a amniotas (Marín et al, 1998, Reiner et al, 1998, Reiner et al, 1984). Sin embargo, estudios recientes basados en técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas han permitido identificar los GB en diversas especies de anamniotas sugiriendo que las principales estructuras reconocibles de los GB, tales como los componentes estriatales y palidales de la porción basal del telencéfalo; ya se encontraban presentes en el cerebro de los vertebrados primitivos, a partir de los cuales evolucionaron los vertebrados mandibulados (Marín et al, 1998, Reiner et al, 1998). A pesar de la presencia de estas estructuras, parecen haber diferencias importantes en las conexiones y en la citoarquitectura. Esto implica un cambio en los GB y en su grado de organización en la transición de anfibios a reptiles (Marín et al, 1998, Reiner et al, 1998, Reiner et al, 1984). Todo parece indicar que desde su aparición en peces agnatos, la evolución de los GB en los anamniotas está altamente conservada. Así, durante la transición evolutiva de anfibios a reptiles ocurre un gran cambio estructural, que podría explicarse por los cambios conductuales y adaptativos que debieron ocurrir al dejar un medio ambiente acuático y colonizar el medio ambiente terrestre, con las consecuentes adaptaciones de los tetrápodos terrestres a la locomoción (Pough et al, 1999) Finalmente, en los amniotas la organización estructural de los GB está altamente

conservada, aunque existen algunas diferencias en algunos circuitos como los palidales entre los mamíferos y los sauropsidos (Reiner et al, 1998).

En general podemos concluir que desde el punto de vista evolutivo, existe una gran conservación tanto anatómica como funcional del sistema de opiáceos, asimismo, desde un punto de vista molecular, los receptores μ han estado presentes en todos los cordados.

Experimentos como los mostrados en la presente Tesis sugieren que los opiáceos son importantes en los ganglios basales ya que están involucrados en diversos procesos fisiológicos. La modulación por opiáceos es al parecer un elemento importante en la regulación del movimiento, que aparición con los primeros depredadores mandibulados y que actualmente resulta indispensable en la regulación de las actividades motoras.

CONCLUSIONES

- Este trabajo confirma resultados previos del laboratorio en el sentido de que la liberación de neurotransmisor en la terminal sináptica corticoestriatal de la tortuga depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo N y P/Q.
- La activación de los receptores μ inhibe la liberación de neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales, sugiriendo un efecto presináptico.
- El bloqueo de canales de calcio tipo N y P/Q no produjo cambios en la inhibición presináptica producida por la activación de los receptores a opiáceos tipo μ ,
- La modulación presináptica producida por la activación de receptores a opiáceos tipo Mu fue ocluida completamente por el bloqueo de canales de potasio por lo que los resultados sugieren que la modulación de la liberación de glutamato en las terminales glutamatérgicas está dada por conductancias de K^+ .

BIBLIOGRAFÍA

1. Aidley JD 1998 *The Physiology of Excitable Cells*. 4 Ed. Cambridge. pp173- 198
2. Albin LR, Young AB and Benny JB 1990 *The Functional Anatomy of basal Ganglia disorders*. TINS 12:366-365.
3. Alexander S.P.H.; A. Mathie y S.J.A. Peter (2004). Potassium channels, in *Guide to receptors and channels*. Br. J. Pharmacol. 141: 583-584, 153 (suppl 2): S1-S209.
4. Alvarez-del-Villar, J. (1977) *Los Cordados. Origen, evolución y hábitos de los vertebrados*. C.E.-C.S.A, México. pp 1-17.
5. Andreas M, Ostermeier MD, Schösser D, Schwender MD and Sutor B 2000 Activation of μ - and δ -opioid receptors causes presynaptic inhibition of Glutamatergic Excitation in neocortical neurons. *Anesthesiology* 93:1053-1063.
6. Andrew, R.D. y F.E. Dudek (1985). Spike broadening in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamic slices. *Brain Res*. 13, 1334(1): 176-179.
7. Augustine GJ 1990 Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. *J Physiol (Lond)* 431:343-364.
8. Bargas J, Ayala GX, Hernández E y Galarraga E (1998). Ca^{2+} -Channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res. Bull.* 45: 521-524.
9. Bargas J, Galarraga E and Aceves J 1998a *Los ganglios Basales. Cap.10. Fisiología. Células, órganos y sistemas*. Comps: Muñoz-Martínez E. J. y García J. FCE.Mex. Vol. 5. pp257-273.
10. Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y and Surmeier DJ 1994 Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely isolated adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14:6667-6686.
11. Barral J, Galarraga E and J Bargas, (1999). Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels. *Brain Res. Bull.* 49: 285-289.
12. Barral J, Mendoza E, Galárraga E y Bargas J (2003) The presynaptic modulation of corticostriatal afferents by μ -opioids is mediated by K^+ conductances. *Eur. J. Pharmacol.* 462: 91-98.
13. Barral J, Poblette F, Pineda JC, Mendoza E, Galarraga E, Bargas J (2001). High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by μ -agatoxin TK. *Eur. J. Pharmacol.* 430:167-173.
14. Barral J, Toro S, Galarraga E. and Bargas J, (2000). GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca^{2+} channels. *Neurosci. Lett.* 283:33-36
15. Birnbaumer L, Campebell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofman F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T and Tsien RW 1994 The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 13:505-506.
16. Björklund A, Hökfelt T and Kuhar MJ 1990 *Neuropeptides in the CNS (handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Pp 9.
17. Carpenter, M.B. (1976) *Human neuroanatomy*. Williams and Wilkins Co. U.S.A. pp 49-70.
18. Catterall WA 1999 Interactions of presynaptic Ca^{2+} channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann NY Acad Sci.* 30(868):144-159.
19. Catterall, WA. 1998. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell. Calcium* 24:307-323.
20. Charpak S, Dubois-dauphin M, Raggenbass M and Dreifuss JJ 1988 Direct inhibition by opioid peptides of neurones located in the ventromedial nucleus of the guinea pig hypothalamus. *Brain Res* 450:124-130.
21. Chen G, y Van der Pol AN. 1998. Presynaptic GABA_B autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channel and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci.* 18(59):1913-1922.
22. Chesselet MF, Delfs JM. 1996. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neuroscienc.* 19:417-422.
23. Childers SR 1991 Opioid receptor-couple second messenger systems. *Life Sci* 48:1991-2003.
24. Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience* 3:115-121.

25. Christie MJ and North RA 1988 Agonists at μ opioid, M_2 muscarinic and $GABA_B$ receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurones.
26. Cohen GA, Doze VA and Madison DV 1992 Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron*. 9:325-335.
27. Cooper RJ, Bloom EF and Roth HR 1996 *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 7 ed. Oxford University.
28. Cuello AC 1978 Endogenous opioid peptides in neurons of the human brain. *Lancet*. 2:291-293.
29. Del-Castillo J. y Katz B. 1954a. *Quantal components of the end-plate potential*. *J. Physiol*. 124: 560-573.
30. Del-Castillo J. y Katz B. 1954b. *Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression*. *J. Physiol*. 124:574-585.
31. Dhawan BM, Cesselin F, Raghbir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS and Hamon M 1996 International Union of Pharmacology. XII. Classification of Opioid Receptors. *Pharmacological Reviews*. 48:567-256.
32. Di-Figlia, M. y N. Aronin. 1982. Ultrastructural features of immunoreactive somatostatin neurons in the rat caudate nucleus. *J. Neurosci*. 2:1267-1274.
33. DiFiguralia M, Aronin N. 1990. Synaptic interactions between GABAergic neurons and trigeminothalamic cells in the rat trigeminal nucleus caudalis. *Synapse* 6(4):358-63.
34. Ding YQ, Kaneko T, Momura S, et al 1996 Immunohistochemical localization of μ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J.Comp.Neurol*. 367:375-402.
35. Dodson PD y Forsythe ID (2004) Presynaptic K^+ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *TRENDS in Neurosciences*. 27 (4): 210-217.
36. Dunwiddie TV and Hass HL 1985 Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol* 369:365-377.
37. Engelman H. S. y MacDermott A. B. 2004. *Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release*. *Nature Reviews*. 5: 135-145.
38. Fassio A, Bonanno G, Fontana G, Usai C, Marchi M, Raiteri M. 1996. Role of external and internal calcium on heterocarrier-mediated transmitter release. *J Neurochem*. 66(4):1468-74.
39. Figueredo-Cárdenas G, Morello M, Sancesario G, Bernardi G, Reiner A. 1996. Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rats. *Brain Research* 735:317-324.
40. Flores-Hernández J, Galarraga E, Vargas J. 1997. Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse*. 25:185-195.
41. Gederman LG, Patridge GJ, Lovinger L and Lovinger MD 2003 It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neuroscience*. 26:184-192.
42. Gohar, O. (2006). Ion Channel Modulation by G-Protein Coupled Receptors. *Modulator* 21:2-8.
43. Graham B and Redman S 1994 A stimulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition. *J. Neurophysiol*. 71:538-549.
44. Graybiel AM (1990) The basal ganglia and the initiation of the movement. *Rev. Neurol. (Paris)* 146:570-574.
45. Graybiel AM, Ragsdale CW, Yoneoka ES, Elde RP. (1981). An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 6: 377-397.
46. Graybiel, A.M. (1990a) The basal ganglia and the initiation of the movement. *Rev. Neurol. (Paris)* 146:570-574.
47. Groenewegen H. J. 2003. *The basal ganglia and motor control*. *Neural Plast*. 10:107-20.
48. Hammond C. 1996. Cellular and molecular neurobiology. Academic Press. N.Y. pp 188-214.
49. Hammond C. 2001. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2^a ed. Academic Press. San Diego. Pp 142-146; 188-214.
50. Henselmans JML, Hoogland PV, Stoof JC .1991. Differences in the regulation of acetylcholine release upon D-2 dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor activation between the striatal complex of reptiles and the neostriatum of rats. *Brain Research* 566:8-12

51. Hernández-Echegaray E.; E. Galarraga y J. Bargas (1998). 3- α -Chloroimperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37:1493-1502.
52. Hille B (2001) *Ion Channel of Excitable Membranes*. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
53. Hille B 1994 Modulation of ion-channels function by G-protein- coupled receptors. *Trends Neurosci.*17(12):531-536.
54. Hirata K, Ohno-Shosaku T, Sawada S, Yamamoto C. 1995. baclofen inhibits GABAergic transmission alter treatment with type-specific calcium channel blockers in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 187: 205-208.
55. Hökfelt T (Eds) 2000 *Handbook of chemical Neuroanatomy. Integrated systems of the CNS. Part III*. Elsevier, Amsterdam, Pp 371-468.
56. Hökfelt T 1991 *Neuropeptides in perspective: the last ten years*. *Neuron.* 7:867-879.
57. Hoogland PV, y Vermeulen-Vanderzee E. 1990. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the telencephalon of the lizard *Gekko gecko*. *Brain, Behavior and Evolution.* 36:378-390.
58. Hughes j, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR 1975 Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonist activity. *Nature (London)* 258:577-579.
59. Iles P 1989 Modulation of transmitter and hormone release by múltiple neural opioid receptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 112:139-233.
60. Isaacson JS and Walmsley B (1995) Counting quanta: direct measurements of transmitter release at a central synapse. *Neuron.* 15:875-884.
61. Ishikawa T, Nakamura Y, Saitoh N, Li WB, Iwasaki S, Takahashi T. 2003. Distinct roles of Kv1 and Kv3 potassium channels at the calyx of held presynaptic terminal. *Journal of Neuroscience*23 (32) 10445-10453.
62. Jaffe JM and Martin WR 1990 opioid analgesics and antagonists. In: *The Pharmacological basis of Therapeutics*. (A Gilman, Rall J, Nies A, y Taylor P eds), Ed. 8 Pergamon Press, New York. 485-573.
63. Jiang ZG and North RA 1992 Pre- and Postsynaptic Inhibition by Opioids in Rat Striatum. *J Neurosci.* 12 (1):356-361.
64. Johnson SW y North RA (1993) Presynaptic actions of opioids. EN: Dunwiddie TV y Lovinger DM (Eds) *Presynaptic receptors in the mammalian brain*. Birkhäuser Boston. pp 71-86
65. Jonas E.A. y Kaczmarek L.K. (1996). Regulation of potassium channels by protein kinases. *Current Opinion Neurobiology.* 6:318-323.
66. José X, Pineda JC, Rodríguez C, Mendoza E, Galarraga E, Bargas J y Barral J (2007) μ Opioids reduce the neurotransmitter release probability by enhancing transient (K_v4) K⁺-currents in corticostriatal synapses as evaluated by the paired pulse protocol *Neurosci Lett.* 414:150-154.
67. José, X. (2005). Identificación de los canales de potasio presentes en las terminales glutamatérgicas de la sinapsis cortico-estriatal de la rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
68. Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (1997) *Neurociencia y Conducta*. Prentice Hall. Madrid. Pp. 129-140, 199-212.
69. Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*. 4a Ed. McGraw-Hill USA. pp 175-298.
70. Katz B (1966) *Nerve, muscle and synapsis*. McGraw-Hill. N.Y. pp.97-110.
71. Katz B and Miledi R 1968 The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol.* 195:481-492.
72. Katz B and Miledi R 1969 Tetrodotoxin- resistant electric activity in presynaptic terminals. *J Physiol (Lond)* 203:459-487.
73. Katz BY, Miledi R. (1970). Futre study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol.* 207:789-801.
74. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC .1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences* 18:527-535.
75. Kita, H. 1993. The GABAergic circuits of the striatum. *Prog. Brain Res.* 99:51-72

76. Koob GC, Sandman A, Strand FL, eds: 1990 A decade of neuropeptides: past, present, and future *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 579.
77. Lacey MG, Mercuri NB and North RA 1989 Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties. *J Neurosci* 9:1233-1241.
78. López H. S. y Brown, A. M. 1992. *Neuromodulation*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:317-322.
79. Lord JA, Walterfield AA, Hughes J and Kosterlitz HW 1977 Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. 267:495-499.
80. Lovinger DM. y Tyler E. 1996. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Int. Rev. Neurobiology*. 39:77-111
81. Lundberg JM 1996 Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacology Review*. 48:113-178.
82. Madison DV and Nicoll RA 1988 Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. *J Physiol* 398: 123-130.
83. Malenka, R.C. y J.D. Kocsis (1988) Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neuroscience* 8: 3750-3756.
84. Mansour A, Fox CA, Akil H and Watson JS 1995 Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *TINS*. 18(1): 22-29.
85. Mansour A, Schafer MKH, Newman SW and Watson SJ 1991 Central distribution of opioid receptors: a cross-species comparison of the multiple opioid systems of the basal ganglia. In *neurobiology of opioids*. Almeida OFX y Shippenberg TS (eds). Pp 169-183.
86. Marín O, González A, Smeets W. 1997. Basal ganglia organization in amphibians: Efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.* 380:16-49
87. Marín O, Smeets W, González A .1998a. Basal ganglia organization in amphibians: chemoarchitecture. *Journal of Comparative Neurology*. 392:285-312.
88. Marín O, Smeets W, Gonzalez A. 1998b. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends Neurosci.* 21:487-494.
89. Matthews G. G. 2001. *Fisiología celular del nervio y el músculo*. Mc Graw Hill Interamericana. España. 227 pp.
90. McGeer PL, McGeer EG, Scherer U, y Singh K. 1977. A glutamatergic corticostriatal path *Brain Res.* 128(2):369-73.
91. Medina L, Reiner A .1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *Journal of Comparative Neurology*. 342: 497-537.
92. Medina L, Smeets WJAJ, Hoogland PV, Puelles L .1993. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivities in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *Journal of Comparative Neurology*. 331:261-285.
93. Meldolesi J., P. Volpe y T. Pozzan .1988. The intracellular distribution of calcium. *TINS* 11:449-452.
94. Mennerick S and Zorumski CF (1995) Paire-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons. *J Physiol (Lond)* 488:85-101.
95. Mihara S and North RA 1986 Opioid increase potassium conductance in guinea-pig submucous plexus neurons by activating δ receptors. *Br. J Pharmacol* 88:315-322.
96. Miller RJ (1998) Presynaptic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:201-227.
97. Miller, C. (1995). The Charybdotoxin Family of K^+ Channel-Blocking Peptides. *Neurona*, 15:5-10.
98. Mink, J. W. (1996) The basal ganglia: Focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.* 50:381-425.
99. Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. 1995. A physiological role for GABA_B receptors and the effects of the baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 46:423-462.
100. Misgeld U, Okada Y, Hassler R. 1979. Locally evoked potentials in slices of rat neostriatum: A tool for the investigation of intrinsic excitatory processes. *Exp. Brain Res.* 34:575-590.
101. Mitz IM, Sabatini BL and Regehr WG 1995 Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 5:675-88.
102. Molina PE, Ahmed N, Ajmal M, Dewey S, Volkow N, Fowler J, y Abumrad N. 1999. Co-administration of gamma-vinyl GABA and cocaine: preclinical assessment of safety. *Life Sci.* 65(11):1175-82.
103. Morita K and North RA 1982 Opiate activation of potassium conductance of myenteric neurons: inhibition by calcium ions. *Brain Res* 242:145-150.

104. Muñoz MD, Gaztelu JM y Austt EG (1998). Homo- and heterosynaptic long-term potentiation in the medial Cortex of the turtle brain in vitro. *Brain Research*. 807: 155 – 159.
105. Nisenbaum ES, Berger TW and Grace AA 1992 Presynaptic modulation by GABA_B receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons. *J Physiol*. 67(2):477-481.
106. North RA 1986 Opioid receptor types and membrane ion channels. *TINS*. 9:114-117.
107. North RA 1993 Opioid actions on membrane ion channels. *Handbook. Exp. Pharmacol*. 104: 773-797.
108. North RA and Williams JT 1985 On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* 364:265-280.
109. North RA and Williams JT, Surprenant A and Christie MJ 1987 μ and δ opioid receptors both belong to a family of receptors which couple to a potassium conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5487-5491.
110. Northcutt RG. (1981) Evolution of the telencephalon in non-mammals. *Ann. Rev. Neurosci*. 4:301-350
111. Penner R, Fasolato C, y Hoth M.1993. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol*. 3:368-374.
112. Penny GR, Afsharpour S, Kitai ST 1986 The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin-, and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for par overlap. *Neuroscience*. 17:1011-1045.
113. Pepper CM and Henderson G 1980 Opiates and opioid peptides hyperpolarize locus coeruleus neurons in vitro. *Science* 209:394-396.
114. Pert CB and Snyder SH 1973 Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc Natl Acad Sci*. 70(8):2243-2247.
115. Piguet P and North RA 1993 Opioid action at mu and delta receptors in the rat dentate gyrus in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 266: 1139-1146
116. Pough, F.H.; C.M. Janis y J.B. Heiser (1999) *Vertebrate life*. 5ª ed. Prentice Hall. pp 3-107
117. Quock RM, Burkey HT, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell MS, Slate AC, Ehlert JF, Roeske RW and Yamamura IH 1999 The δ -opioid Receptor: Molecular Pharmacology, Signal Transduction, and the determination of Drug Efficacy. *Pharmacological Review*. 51: 503-532.
118. Reiner A, Medina L y Veenman CL (1998) Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res. Rev*. 28: 235-285.
119. Reiner A, Medina L, Haber SN .1999. The distribution of dynorphinergic terminals in striatal target regions in comparison to the distribution of substance P-containing and enkephalinergic terminals in monkeys and humans. *Neuroscience*. 8:775-793.
120. Reiner A, y Anderson KD. 1990. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Research Reviews*. 15:251-265.
121. Reiner A., S.E. Brauth y H.J. Karten (1984b) Evolution of the amniote basal ganglia. *TINS* 7: 320-325.
122. Reisine T and Brownstein JM (1994) Opioid and cannabinoid receptors. *Neurobiology*. 4:406-412
123. Reisine y Pasternak (1996). Analgésicos opiodes y sus antagonistas. 23:557-593.
124. Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ and Charlton MP 1993 Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron*. 11:645-655.
125. Rommer, A.S. (1973) *Anatomía Comparada (Vertebrados)*. 4ª Ed. Editorial Interamericana, México. pp 28-74.
126. Sarnat H.B. y M.G Netsky (1976) *Evolución del sistema nervioso* Ed. Blume, España. pp. 307-360.
127. Schafer MKH, Day SJ, Watson et al, 1991. Distribution of opioids in brain and peripheral tissues. In: *Neurobiology of Opioids*. Eds. O.F.X. Almeida and TS Shippenberg. Berlin, Springer-Verlag, pp. 53-62.
128. Shen KZ and Johnson WS 2002 Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioid receptor in rat subthalamic nucleus in vitro. *J Physiol* 541:219-230.
129. Shepherd GM. (2004). *The synaptic organization of the brain*. Ed. 5ª ed. Oxford University Press. USA. 719 págs.

130. Simmons LM and Chavkin C 1996 Endogenous opioid regulation of hippocampal function. *Int Rev Neurobiol.* 39:145-196.
131. Simon AM y Goudenough DA. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in Cell Biology.* 8:477-483.
132. Simon EJ and Hiller 1978 The opiate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol.* 18:371-394.
133. Simon EJ and Miller JM 1994 Opioid peptides and opioid receptors. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.* Ed. GJ Siegel. 5th Ed. New York, Raven Press, pp 321-339. .
134. Smeets W, Marín O, González A. 2000. Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *Review J. Anat.* 196:501-517.
135. Smith Y, Devan MD; Shink E, Bolam JP. 1998 Microcircuits of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
136. Smith-Nielsen T. 1997. *Animal physiology. Adaptation and environment.* Fifth Edition. Cambridge University press.
137. Standifer KM and Pasternak GW 1997 G-protein and opioid receptor-mediated signaling. *Cell Signal* 9:237-248.
138. Strand LF (1999) *Neuropeptides. Regulators of physiological processes.* Massachusetts Institute of Technology. Pp 122-140.
139. Surmeier DJ, Kita H, y Kitai ST. 1988. The expression of gamma-aminobutyric acid and Leu-enkephalin immunoreactivity in primary monolayer cultures of rat striatum. *Brain Res.* 470(2):265-82.
140. Takagi, H.; P. Somogyi; J. Somogyi y Smith AD. 1983 Fine structural studies of a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 214:1-16.
141. Takahashi T, Kajikawa Y, y Tsujimoto T. 1998. G-protein coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA_B receptor *J. Neurosci.* 18:3138-3146.
142. Tanaka and North 1994 Opioid actions on rat anterior cingulate cortex neurons in vitro. *J Neurosci.* 14(3):1106-1113.
143. Thorlin T, Eriksson SP, Hansson E and Rönnbock 1997 (D-Pen^{2,5}) enkephalin and glutamate regulate the expression of μ -opioid receptors in rat cortical astrocytes. *Neuroscience.* 232:67-70.
144. Torres, F.M. (2007). Identificación de los canales de potasio presinápticos en la sinapsis cortico-estriatal de rata mediante el empleo de bloqueadores específicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
145. Vincent SR, Reiner PB. 1987. The immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the cat brain. *Brain Research.* 18:371-415.
146. Wang H and Pickel MV 2001 Preferential Cytoplasmic Localization of δ -opioid receptors in rat striatal patches: comparison with plasmalemma μ -opioid receptors. *J Neuroscience.*
147. Werz MA and Macdonald RL 1983 Opioid peptides with differential affinity for mu and delta receptors decrease sensory neurones calcium-dependent action potentials. *J Pharmacol Exp Ther* 227:394-402
148. Wheeler D.B.; A. Randall y R.W. Tsien. 1994a. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 264:107-111.
149. Wheeler D.B.; R.W. Tsien y A. Randall. 1994b. Identification of calcium channels that control neurosecretion. *Science.* 266:828-831.
150. Williams JT, Egan TM and North RA 1982 Enkephalin opens potassium channels in mammalian central neurones. *Nature (London)* 299:74-76.
151. Williams JT, North RA and Tokimasa T 1988 Inward rectification of resting and opiate-activated potassium currents in rat locus ceruleus neurons. *J Neuroscience.* 8:4299-4306.
152. Wilson (2004). *The Basal ganglia.* En: *The synaptic organization of the brain.* (Shepherd, ed) Ed. 5^a ed. Oxford University Press. USA. 719 págs.
153. Wilson C. 1998. *The Basal Ganglia.* In: Shepherd, G.M. (Ed) *The synaptic organization of the brain.* 4^a Ed. Oxford University press. N.Y. pp 329-375.
154. Wilson C. 1998. *The Basal Ganglia.* In: Shepherd, G.M. (Ed) *The synaptic organization of the brain.* 4^a Ed. Oxford University press. N.Y. pp 329-375.
155. Woolf NJ .1991. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology.* 37:475-524.

156. Wu, L.G. y P. Saggau (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *TINS* 20(5):204-212.
157. Yoshimura M and North RA 1983 Substantia gelatinosa neurones in vitro hyperpolarized by enkephalin. *Nature (london)* 305:529-530.
158. Yuan X, Madamba S and Siggins GR 1992 Opioid peptides reduce synaptic transmission in the nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 134:223-228.
159. Zimmerman H (1993) *Synaptic transmission, cellular and molecular basis*. Oxford University Press. N.Y. pp 111-1.