



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

*"Papel de los canales de calcio en las
propiedades de disparo de las neuronas
espinosas medianas del estriado de la tortuga"*

TESIS

Que para obtener el Título de

BIOLOGO

Presenta:

Miguel Ángel Mata Herrera

DIRECTOR DE TESIS Dr. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de Mex. 2012



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.

„Y en cuanto a mí, si por alguna posibilidad existe algo de valor en mí todavía no descubierto, si alguna vez voy a merecer alguna fama verdadera a la que poder ambicionar razonablemente en este mundo pequeño pero muy silencioso, si llego a hacer algo que valga la pena que un hombre lo haga, no que lo deje sin hacer, si a mi muerte mis albaceas, o con más propiedad, mis acreedores encuentran algún precioso manuscrito en mi escritorio, entonces atribuyo todo el honor y gloria a la pesca de la ballena, porque un ballenero ha sido mi Yale y mi Harward.”

Chapter xxiv, The Advocate

„Moby Dick”

Herman Melville

Para mi mamá

*Por su sacrificio y esfuerzo para que nunca nos faltara nada.
Por haber hecho todo lo que estuvo de ella para que yo llegara hasta
aquí.*

Para Bere

*Por estar ahí siempre
Por regañarme, aconsejarme y ser mi hermana menor y mayor al mismo
tiempo.*

Para Magui

*Por darme siempre ese empujo para no dejarme caer cuando se veía
todo perdido.
Y sobre todo, por creer en mí.*

Infinitamente gracias.

Agradecimientos.

A Beto por ser un ejemplo de esfuerzo y lucha constante, por enseñarme que siempre hay que ser el mejor en lo que haces.

A mi papá por estar ahí, apoyándome y por el ánimo que siempre me ha dado, pero principalmente durante la elaboración de la tesis.

A mis tíos Alejandro y Javier por todo el apoyo incondicional que me brindaron durante toda la carrera y en el proceso de la tesis.

A Tere, Dan, Yesell y Edgar por las largas comidas y todas las discusiones.

A Aaron, por enseñarme y transmitirme esa pasión por la electrofisiología.

A mi tutor y amigo Jaime Barral por las pláticas, chistes y discusiones. Gracias por haberme enseñado tanto.

Y a todos los que de alguna forma u otra hicieron posible la finalización de este trabajo.

Por supuesto a todas las tortugas que permitieron que este trabajo se realizara

A mis sinodales:

Dra. Bertha Segura Alegría
Dra. Mónica González Isais
Dr. Juan Manuel Arias Montaña
Biol. Hugo Jesus Castro Cortes

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero de: (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 (IN2132310)**. (2) **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** a través de **Programa de Apoyo a la Investigación en Ciencia Básica (167147)**. (3) **Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA)**, Periodo 2010-2011.

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 comprendido de Agosto de 2010 a Diciembre de 2011.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

Proyecto Neurociencias, UIICSE. FES Iztacala, UNAM.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México

Agosto 2012

INDICE

Resumen.....	1
Introducción	2
Ganglios Basales.....	2
Evolución de los GB.....	3
Peces y anfibios.....	3
Reptiles, aves y mamíferos.....	5
Circuito sináptico de los GB.....	7
Neuronas espinosas medianas (NEMs).....	9
Patrones de disparo de las NEMs.....	10
Interneuronas estriatales.....	11
Postpotencial hiperpolarizante (PPH).....	11
Componentes del PPH.....	12
Canales iónicos.....	14
Canales de Ca ²⁺	15
Propiedades moleculares.....	20
Hipótesis de trabajo y justificación.....	22
Objetivos.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Particulares.....	23
Metodología.....	24
Organismos y obtención de rebanadas de cerebro.....	24
Registro Intracelular.....	25
Protocolo experimental.....	25
Curvas corriente-voltaje.....	26
Curvas Corriente-Frecuencia.....	26
Fármacos.....	27
Análisis de Datos.....	27

Resultados	28
Presencia de canales de Ca ²⁺ en las NEMs	28
La función de los canales tipo L.....	30
El papel de los canales P/Q y N en la frecuencia de disparo.....	35
Discusión	38
Conclusiones	42
Referencias.....	43

Resumen

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales altamente conectados entre sí, en mamíferos no primates las neuronas espinosas medianas (NEMs) constituyen 95% de la población total (Bennett y Wilson, 2000). Estudios recientes indican que la organización funcional de los principales circuitos de salida del estriado en aves y reptiles es muy similar a los de mamíferos (Reiner et al., 1998).

Con la finalidad de estudiar la participación de las conductancias de Ca^{2+} en las propiedades de disparo de las NEM del estriado dorsolateral de la tortuga, y utilizando técnicas de registro intracelular convencionales, en la modalidad de fijación de corriente. Se obtuvieron registros del disparo de potenciales de acción de las NEM en rebanadas de cerebro de tortuga. Esto se logro a partir de potenciales de mantenimiento de -60 Y -80 mV. Se utilizaron bloqueadores específicos e inespecíficos de los canales de Ca^{2+} .

El papel individual que desempeña cada tipo de canal de Ca^{2+} en el disparo repetitivo de las NEMs, difiere con lo reportado previamente en mamíferos.

El papel de los canales tipo L y N está ligado al cambio de la meseta a la que se producen los potenciales de acción y no en la regulación en la frecuencia de disparo. Por otro lado, son los canales P/Q los que actúan directamente sobre la frecuencia de disparo.

Palabras clave: Neuronas Espinosas Medianas, Ganglios Basales, Canales de Calcio, Estriado Dorsolateral; Cerebro de tortuga.

Introducción

Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales altamente conectados entre sí. En mamíferos, la región que ocupan está en el centro del telencéfalo rodeada por el margen dorsolateral por la corteza cerebral (Steiner y Tseng, 2010), en aves y reptiles abarcan el telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo (Bargas et al., 1998; Wilson, 2004). El grado de semejanza entre diferentes especies, así como su tamaño relativo respecto a otras estructuras corporales, hace pensar que su organización estructural cumple funciones

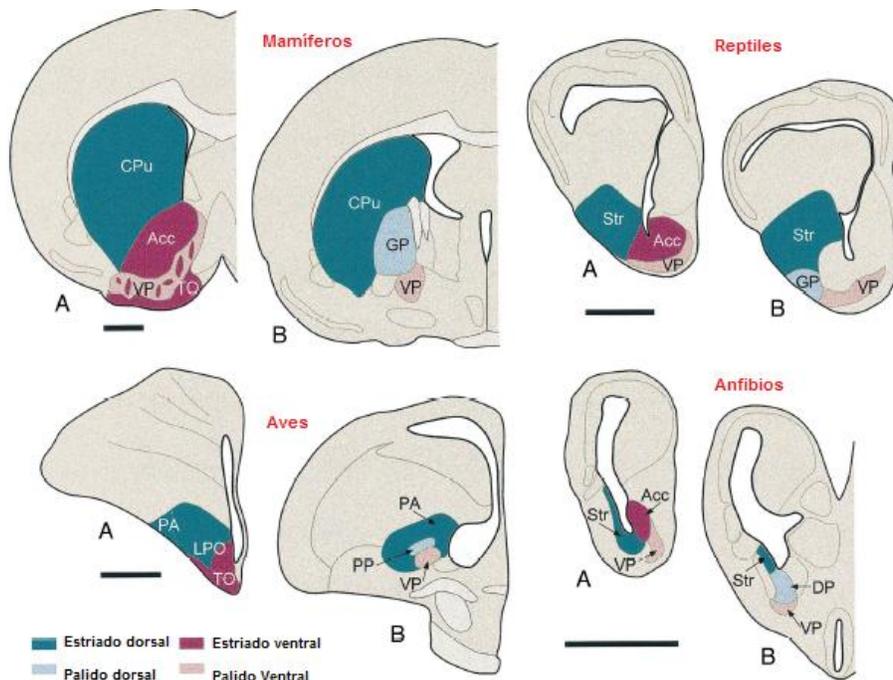


Figura 1. Los ganglios basales están organizados en sistema estriatopalidal dorsal y ventral en todos los tetrápodos. Para cada clase de vertebrados se muestran dos cortes coronales de cerebro representativos (A, rostral; B, caudal), que ilustran la posición relativa de las estructuras estriatales y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

esenciales en el cerebro en los vertebrados terrestres. Estudios recientes indican que la organización funcional de los principales circuitos del estriado en aves y reptiles es muy similar a los de mamíferos (Fig.1) (Reiner et al., 1998).

La principal entrada a los GB proviene de las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral (Steiner y Tseng, 2010) y de los núcleos intralaminares del tálamo (Reiner et al., 1998); estas entradas convergen en los núcleos caudado y putamen, que comparten la misma organización celular, por lo que se consideran como uno solo núcleo, y junto al núcleo accumbens conforman el estriado (NE), que son los principales núcleos de entrada (Wilson, 2004), aunque en los primates el caudado y el putamen se encuentran separados por el haz de fibras que constituye la capsula interna (Groenewegen, 2003).

Los núcleos de salida de los GB están conformados por el globo pálido interno (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Además, cuenta con la sustancia nigra compacta (SNc), globo pálido externo (GPe) y el subtálamo como núcleos intrínsecos que conectan entre sí los núcleos de entrada y salida (Bargas et al., 1998; Reiner et al., 1998; Wilson, 2004).

Evolución de los GB

Peces y anfibios

Mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas han permitido identificar los GB en diferentes especies de anamniotas y ayudar a comprender muchos aspectos de su organización y conexión. Sin embargo, durante la transición evolutiva de anfibios a reptiles ocurrió un cambio estructural en los GB, que puede explicarse por los cambios conductuales y adaptativos que debieron ocurrir al dejar el medio acuático y pasar al terrestre (Northcutt, 1981; Striedter, 1997; Pough et al., 1999; Ariëns-Kappers et al., 1936). Aunque se pueden observar ciertas características sobre la evolución de los GB en anamniotas.

En lampreas, existe una porción del telencéfalo que esta evaginada (Murakami, 2008), esta zona se conoce como zona ventromedial y se encuentra en el mismo lugar que el subpálido de muchos peces mandibulados (Pombal et al.,

1997a, b) y presenta abundantes neuronas sustancia-P-érgicas (SP) y encefalinérgicas (ENK) positivas con espinas dendríticas (Nozaki y Gorbman, 1986; Nozaki et al., 1984; Pombal et al., 1997b; Meléndez-Ferro et al., 2002; Auclair et al., 2004; Robertson et al., 2007). La zona ventromedial recibe aferentes dopaminérgicas del tubérculo posterior del cerebro medio y diencefalo, el homólogo aparente de la SN en mamíferos (Pierre et al., 1994; Pombal et al., 1997a). De esta forma, la región telencefálica ventromedial aparenta ser el estriado en lampreas, ya que las aferentes dopaminérgicas son similares en función a mamíferos (Grillner et al., 2000)

Estudios neuroquímicos indican que el límite palial-subpalial, en elasmobranquios, está localizado en el borde lateral superior de un grupo de células basales llamado Área Superficialis Basalis (ASB), y que la región que se encuentra entre el ASB y el ventrículo lateral (el área periventricular ventrolateral APVL) del telencefalo representa los GB (Northcutt et al., 1988; Carrera et al., 2008a; Ferreiro-Galve et al., 2008). El ASB es rica en neuronas GABAérgicas, SP y ENK (Northcutt et al., 1988; Reiner y Carraway, 1985, 1987; Rodríguez-Moldes et al., 1993; Carrera et al., 2008a), por este motivo, al menos una porción del ASB podría ser comparada con los globos pálidos de mamíferos.

Varios estudios muestran que el tubérculo posterior y el tegmentum también proyectan al tectum ipsilateral en tiburones y rayas (Smeets, 1982) sugiriendo un circuito estriado-SNr-tectum en peces cartilaginosos. Así, el tectum tiene proyecciones descendentes a un grupo de células motoras y premotoras en tiburones, que se asemeja al cerebro medio en mamíferos (Smeets, 1981) de esta forma, los GB, en peces cartilaginosos, pueden inducir el movimiento por neuronas que proyectan al circuito estriado-SNr-tectum.

La región por debajo del palio medial en poliptéridos se conoce como parte dorsal del área ventral o Vd y se ha encontrado que tiene un gran número de neuronas SP y ENK positivas, además de contar con aferentes dopaminérgicas (Reiner y Northcutt, 1992). Estas características indican que el Vd corresponde al estriado en polipteridos.

El Vd en condriictios, holósteos y teleósteos también presentan neuronas SP y ENK (Vecino et al., 1989, 1992, 1995; Batten et al., 1990; Pinuela y Northcutt, 2007) estas neuronas son, probablemente, representantes de las neuronas NEMs GABAérgicas del estriado de mamífero (Martinoli et al., 1990; Anglade et al., 1999). Consistente con las aferentes dopaminérgicas, el Vd es abundante en receptores D₁ y D₂ (Kapsimali et al., 2000; Vacher et al., 2003).

Se ha encontrado que en peces de aletas lobuladas el telencéfalo ventrolateral contiene al estriado y globos pálidos. En la parte medial se encuentran neuronas SP y ENK e inervaciones dopaminérgicas (Reiner y Northcutt, 1987, Vallarido et al., 1998).

El telencéfalo ventrolateral de anfibios contiene al estriado y globos pálidos. En el estriado en anuros y urodelos existen neuronas SP y ENK y evidentes inervaciones dopaminérgicas (Inagaki et al., 1981; Taban y Cathieni, 1983; González y Smeets, 1991). La identificación del estriado en anfibios es más certera por la gran expresión de GAD (Papalopulu y Kintner, 1993).

Reptiles, aves y mamíferos

Los mamíferos y los reptiles comparten un origen común del tronco amniotas descendientes de anfibios (Gauthier et al., 1988; Lee, 1993, 1997), pero evolucionaron divergentemente al inicio de la evolución amniota. Aunque existan diversas clasificaciones en reptiles, las evidencias indican que las principales funciones de la organización de los GB ya están presentes en reptiles (ver Fig., 1).

Los GB en reptiles reflejan la herencia de anfibio, ya que el hemisferio telencefálico en reptiles presenta la misma evaginación tubular que ellos, pero presentan características que muestran la expansión del tálamo y pálido, característico en reptiles.

Algunas características importantes del estriado en reptiles muestran que las neuronas ocupan la mayor parte de la pared telencefálica ventromedial, además de una mayor presencia de colinesterasa, terminales dopaminérgicas y receptores dopaminérgicos (Parent, 1986; Richfield et al., 1987; Smeets, 1994). Como en el estriado de mamíferos, las aferentes dopaminérgicas que vienen de la

SNc son reguladas por receptores D1 y D2 (Smeets, 2001, 2003).

La SNr en reptiles, al igual que en mamíferos, proyecta al tectum y este a su vez proyecta a los centros motores y premotores en el troco cerebral y cordón espinal (Reiner et al., 1980; Reiner, 1994; Medina y Smeets, 1991).

En tortugas y cocodrilos los GB tienen una principal proyección a un grupo de células del pretectum que contienen ENK, GABA y LANT6 (Reiner, 1987; Reiner y Carraway, 1987; Muñoz et al., 1998). Este grupo de células es nombrado núcleo dorsal de la comisura posterior (nDCP), en reptiles, proyecta a las capas profundas del tectum del cerebro medio. Este circuito aporta una ruta adicional por la cual los GB pueden estimular el movimiento en reptiles (Reiner et al., 1980; Medina y Smeets, 1991).

Las aves evolucionaron de arcosaurios, de los cuales los cocodrilos son el único representante actual (Chiappe, 1995; Edinger et al., 1903). Por lo que los GB en aves son muy parecidos a los de los reptiles, con algunas diferencias notables, como el alargamiento del telencéfalo y la evolución de un grupo distinto de células en aves canoras desarrollado para el control vocal (Perkel et al., 2002; Wada et al., 2004).

Uno de los circuitos de los GB mejor conservados es el que establece conexiones con el tectum mesencefálico, que corresponde al colículo superior de los mamíferos, las proyecciones eferentes del tectum llegan a diferentes centros del cerebro medio y de la médula espinal (Wilson, 2004), por lo que los GB tienen un acceso directo a las funciones motoras específicas, como las que intervienen en la orientación espacial, conductas defensivas, movimientos sacádicos y cambios en la fijación de la mirada. En los mamíferos esas vías representan rutas adicionales hacia centros motores inferiores además de la vía estriato-palidaltálamo-cortical (Bargas et al., 1998; Reiner et al., 1998; Wilson, 2004).

Varios estudios sugieren que el papel general de los GB está enfocado a la ejecución de los movimientos, las estrategias y la interpretación de la información sensorial (Wilson, 2004). La lesión, estimulación, bloqueo o manipulación

farmacológica de cualquiera de los núcleos que conforman a los GB produce trastornos en la ejecución de los actos motores (Galarraga y Bargas, 1998).

Circuito sináptico de los GB

Las conexiones de los GB a sus estructuras blanco, son inhibitorias y actúan por modulación a través de otros circuitos. La salida del NE son proyecciones exclusivas de otras estructuras de los GB, donde los principales blancos son el GPe y GPi, la sustancia nigra pars compacta SNc y pars reticulata SNr. El GPi y la SNr proyectan a las estructuras fuera de los GB y proporcionan la principal vía de salida. Proyecciones hacia el tálamo, a su vez proyectan hacia la corteza frontal, los núcleos habenules y la capa profunda del colículo superior.

Las NEMs del estriado dirigen sus axones hacia la SNc y reciben aferentes de ella. El GPi proyecta hacia el tálamo ventral lateral y éste a su vez envía terminales a regiones motoras de la corteza. El GPe mantiene proyecciones reciprocas al núcleo subtalámico (NST), éste, proyecta a la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior VA y dorso-medial MD Estos núcleos proyectan hacia las regiones límbicas de la corteza (Wilson, 2004; Bargas et al., 1998; Reiner et al., 1998). Así mismo en el diagrama mostrado en la figura 2, se muestran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías. Acetilcolina (ACh), Dopamina (DA), Dinorfina (Dyn), Encefalinas (ENK), Glutamato (Glu), Acido γ -aminobutírico (GABA), Neurotensina (Nt) y sustancia-P (SP).

En mamíferos se han descrito algunos circuitos corticales que coinciden en el NE (Lovinger y Tyler, 1996):

- A. El circuito sensorial motor, cuyas aferencias provienen de las cortezas motora primaria, premotora y suplementaria e incide en el putamen;
- B. El circuito oculomotor, con proyecciones de las cortezas parietal posterior, prefrontal y frontal, hacia el cuerpo del núcleo caudado;

- C. El circuito de asociación, que recibe aferencias de las cortezas parietal, premotora y prefrontal dorsolateral, estableciendo sinapsis con neuronas de la cabeza del núcleo caudado;
- D. El circuito límbico que involucra proyecciones al estriado ventral y la cabeza del núcleo caudado.

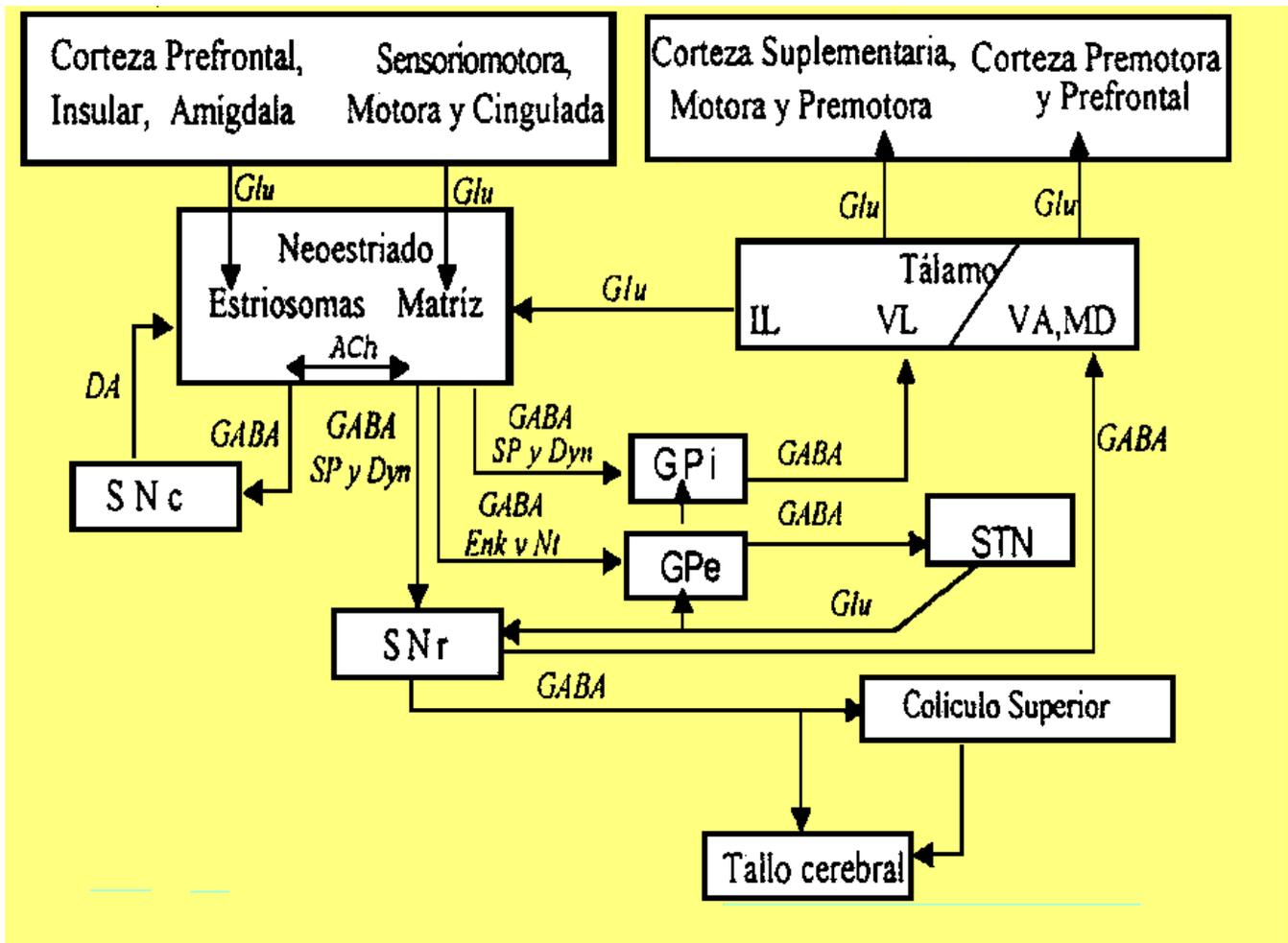


Figura 2. Circuitos sinápticos de los ganglios basales. Se muestra la compartimentalización de la entrada cortical hacia el núcleo estriado tal como se observa en los mamíferos actuales. (Tomado de Barral, 2001).

Neuronas espinosas medianas (NEMs)

En los primates y en la rata las NEMs constituyen el 97% y el 95% respectivamente de la población de neuronas neostriatales (Bennett y Wilson, 2000). Las NEMs son neuronas GABAérgicas de proyección y son el blanco de las aferentes provenientes de la corteza (Kita y Kitai, 1993), se estima que cada NEM recibe entre 12,500 y 15,000 entradas glutamatérgicas provenientes de la corteza y de las aferentes talámica principalmente (Bennett y Wilson, 2000). Cada NEM recibe entre 1 y 10 sinapsis de una sola neurona cortical, por lo tanto, entre 750 y 7,500 neuronas cortico-estriatales inervan a una sola NEM (Wilson, 2004; Bennett y Wilson, 2000). Toman su nombre por su apariencia morfológica, ya que el tamaño de su soma es aproximadamente de 10-20 μm de diámetro, así como por el número de espinas que cubren sus dendritas (DiFiglia et al., 1976; Wilson y Groves, 1980; Bishop et al., 1982). Los axones de estas neuronas proyectan fuera del NE y establecen sinapsis en la SN y en el GPe, formando las conocidas vías directa e indirecta de los ganglios basales (Wilson, 2004).

El registro electrofisiológico en rebanadas muestra que en los mamíferos el potencial de reposo de las NEMs se encuentra a valores muy negativo (-75 a -80 mV), por lo que para generar potenciales de acción requieren de un número elevado de entradas corticales glutamatérgicas, alcanzando el potencial umbral a valores cercanos a -55 mV, (Bargas et al., 1998; Wilson, 2004; Reiner et al., 1998).

Las NEMs están involucradas en dos de los componentes principales del sistema de proyección de los GB, la vía directa e indirecta. La vía directa está formada por neuronas que tiene proyecciones directas al GPi y a la SN. Aportan entradas directas a las neuronas de los núcleos de salidas de los GB, mientras que en la vía indirecta que las NEMs proporcionan entradas al GPe, el cual, junto con el núcleo subtalámico integran el principal componente de esta vía (Steiner y Tseng, 2010). Estas dos vías principalmente muestran la naturaleza dual de la salida neostriatal (Wilson, 2004).

Patrones de disparo de las NEMs

Las NEMs presentan al menos cinco tipos principales de conductancias iónicas que influyen directamente en el patrón de disparo neuronal (Galarraga y Bargas, 1998). Algunas de ellas están asociadas a los canales de Ca^{2+} .

- A. *Corrientes salientes persistentes*, repolarizan el potencial de membrana durante el potencial de acción y generan el ritmo de disparo en ráfaga, genera la adaptación de frecuencia de disparo.
- B. *Corrientes entrantes persistentes o que se inactivan lentamente* sostienen una determinada frecuencia de disparo por largo tiempo, generan propiedades biestables, generar potenciales despolarizantes lentos y produce la liberación de neurotransmisores.
- C. *Corrientes entrantes transitorias o que se inactivan rápido*, genera potenciales de acción “todo o nada” y despolarización transitoria.
- D. *Corrientes salientes transitorias, que se inactivan rápido*, generan latencia prolongada del disparo, baja frecuencia y disparo rítmico.
- E. *Rectificadores entrantes o anómalos*, fija el potencial de membrana en reposo, se opone a la hiperpolarización excesiva, integra las entradas sinápticas de las dendritas.

Interneuronas estriatales

La población neuronal restante del NE, y que está estrechamente ligado a las NEMs está conformada por interneuronas. Estudios anatómicos en el NE han mostrado una gran diversidad en la morfología de las interneuronas. Sin embargo; sólo 3 tipos han sido aceptados, y se catalogan con base en su funcionalidad y estructura (Wilson, 2004; Kita, Kitai, 1993):

- A. Interneuronas colinérgicas grandes (somas de 30 a 50 μm de diámetro) que constituyen al menos el 2 % del total de células del NE, pero que exhiben grandes árboles dendríticos y ejercen una poderosa influencia sobre el disparo de las neuronas de proyección.
- B. Células en canasta que contienen GABA y parvalbúmina (Kita et al., 1993). Son células no-espinosas que rodean a los somas de las NEM. Conforman del 3 al 5 % del total de la población neuronal. Presentan disparo rápido y exhiben potenciales de acción de corta duración y un postpotencial hiperpolarizante (PPH) pequeño; lo que permite el disparo sostenido a altas frecuencias y sin adaptación (Kawagushi, 1993).
- C. Células que además de GABA coliberan somatostatina y óxido-nítrico. Representan menos del 2 % de la población neuronal (Wilson, 2004). Se trata de neuronas que presentan un disparo regular, pronunciada adaptación a la frecuencia de disparo y potenciales con despolarización sostenida (Kawagushi, 1993).

Postpotencial hiperpolarizante (PPH)

Como se mencionó previamente, existen múltiples conductancias iónicas que generan potenciales transmembranales cuando no hay potenciales de acción, esto es, durante el intervalo de tiempo entre dos potenciales de acción (PA) y son

estas conductancias las que generan las características del patrón temporal de disparo (Connors et al., 1982; Adams, 1982).

El intervalo entre 2 (PA) se conoce como intervalo inter-espiga y presenta gran variabilidad de una célula excitable a otra. En gran medida, las conductancias iónicas encargadas de intervalo inter-espiga son también las que generan el postpotencial hiperpolarizante (PPH).

El PPH es un evento eléctrico complejo que sigue a casi todo PA y puede ser provocado por diferentes conductancias iónicas (Barrett, 1976; Goh y Pennefather, 1987).

Calvin y Schwindt (1972) describieron que en el curso temporal del voltaje en el intervalo inter-espigas pueden distinguirse 2 procesos independientes: un “ahondamiento” inicial que produce la máxima hiperpolarización y una “rampa” ascendente que regresa el voltaje al umbral de disparo. Estos 2 procesos se modifican de manera independiente. Mientras que el ahondamiento inicial permanece relativamente constante, la rampa ascendente incrementa su pendiente cuando el disparo pasa del intervalo primario al intervalo secundario de la relación IF (Fig. 3) (Baldissera y Gustafsson, 1973; Calvin y Schwindt, 1972).

Componentes del PPH

El PPH tiene al menos dos componentes en las NEM uno rápido y un componente lento (Pineda, 1992). El componente rápido (PPH_R) sigue a continuación de la repolarización del PA, dura 2 o 3 milisegundos y termina con una breve despolarización (Kandel, 1961; Barret y Barret, 1976). Este componente no siempre se encuentra bien delimitado y generalmente se observa como un pico hiperpolarizante que sigue a la repolarización del PA (Barret y Barret, 1976; Storm, 1987; Schwindt et al., 1988a). Su amplitud es reducida tanto por la hiperpolarización de la membrana como por el incremento de la concentración extracelular de K⁺. Esto indica que se debe principalmente a este ión (Connors et al., 1982), principalmente las conductancias I_A e I_C de potasio debido a su cinética,

las cuales cumplen diferentes papeles durante la repolarización del PA. La I_A provee un rápido inicio a la repolarización (Belluzzi, 1985), pero la I_C asegura su finalización y es bloqueada con Ba^{2+} , 4-AP y TEA (Lancaster y Adams, 1986; Haylett et al., 1990).

El componente lento (PPH_L) constituye la mayor parte del PPH. Puede durar cientos de milisegundos y después de un tren de espigas puede durar varios segundos (Foehring et al., 1989; Kuba, 1980; Lancaster y Nicoll, 1987; Lorenzon y Foehring, 1992; Pennefather et al., 1985; Schwindt et al., 1988a). En neuronas nigrales, estriatales, motoras y piramidales (Schwindt et al., 1988a) el PPH_L puede ser bloqueado por Apamina (Galarraga et al., 1989; Pineda et al., 1992).

En neuronas del caracol *Helix sp*, las colas de corriente exhiben cuando menos dos procesos exponenciales alejándolas del modelo de Hodgking y Huxley sugiriendo que la activación de la corriente de potasio tiene cuando menos dos componentes. Ambos componentes desaparecen en presencia de TEA y uno de ellos en ausencia de Ca^{2+} (Meech y Standen, 1975), lo que lleva a pensar que el componente adicional es una conductancia de K^+ dependiente de Ca^{2+} . Esto fue apoyado por la relación corriente/voltaje (I/V) que estas células adopta la forma de “ n ” característica (Hille, 1992). Esta forma de “ n ” se debe a la disminución de la magnitud de la corriente respecto el potencial de membrana se acerca al potencial de inversión del Ca^{2+} .

La forma “ n ” se pierde en solución libre de Ca^{2+} o en presencia de sus bloqueadores. Además el componente dependiente de Ca^{2+} puede activarse directamente con inyección de Ca^{2+} al interior celular (Adams y Galvan, 1986; Hille, 1992). El incremento y decaimiento de las conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} siguen estrechamente el curso temporal del cambio de $[Ca^{2+}]$ intracelular (Gordman y Thomas, 1980). Esto demuestra que las conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} obedecen cambios en la $[Ca^{2+}]$ intracelular.

La afluencia de Ca^{2+} en las NEMs desempeña un papel importante en el ajuste de la frecuencia de disparo, en parte por la activación de conductancias de K^+ (Pineda et al., 1992). Cuando entra Ca^{2+} a través de canales de tipo N y P/Q

activa corrientes de Ca^{2+} dependientes de K^+ que subyacen el PPH. La reducción del PPH podría estar involucrada en los cambios en la frecuencia de disparo (Pérez-Garci et al., 2003; Bargas et al., 1994; Pineda, 1992).

La entrada de Ca^{2+} a la célula de manera segregada y especializada puede promover diferentes eventos fisiológicos.

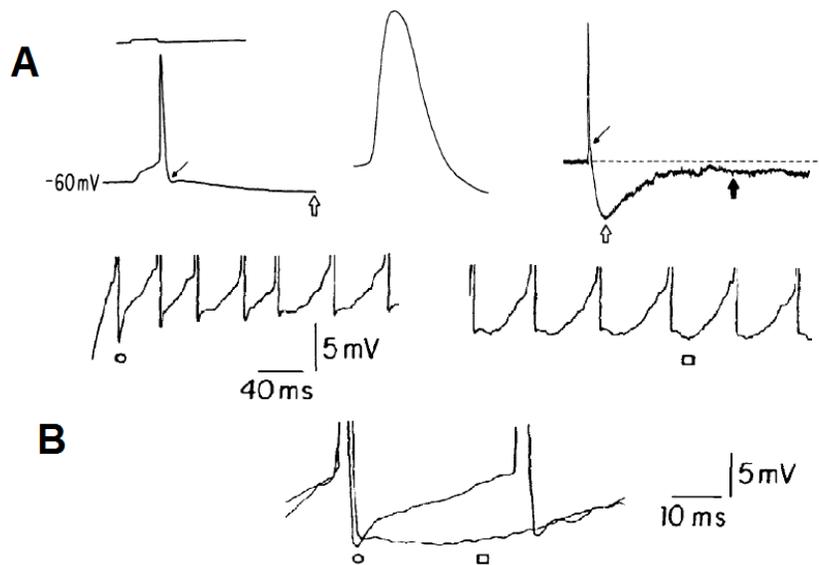


Figura. 3. Componentes del PPH. A. PPH después de un solo PA. A. La flecha obscura muestra el componente rápido y la flecha vacía el componente lento. B. PPH después de un tren de PA, de la misma forma la flecha obscura muestra el componente rápido y la flecha vacía el componente lento. Tomado de Pineda et al., 1992.

Canales iónicos

El sistema nervioso tiene como función recibir información del medio ambiente, integrarla y emitir las respuestas correspondientes. Estas operaciones se realizan gracias a la variación en la frecuencia y en el ritmo de aparición de las señales eléctricas neuronales. Muchas de estas señales poseen amplitud y duración relativamente homogéneas, que se propagan a altas velocidades a

través de las fibras nerviosas y son conocidas como potenciales de acción (Hodgkin y Huxley, 1952).

La señalización eléctrica en el sistema nervioso implica movimiento de iones a cada lado de la membrana citoplásmica, de los cuales, los principales son Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , que pasan a través de proteínas transmembranales que tienden a equilibrar las concentraciones de los iones (Hammond, 2001).

Los canales iónicos poseen propiedades importantes: conducen, reconocen y seleccionan iones específicos, se abren y cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas específicas (Kandel et al., 2000) y son reguladores cruciales de la excitabilidad neuronal (Dodson y Forsythe, 2004).

Cuando un estímulo adecuado llega a una célula, produce una despolarización de la membrana, generando la apertura de canales que conducen corrientes entrantes que despolarizan aún más a la membrana. Si el estímulo es lo suficiente fuerte, el cambio en la concentración interna de la célula facilitara que esta llegue al umbral de disparo, produciendo el conocido potencial de acción “todo o nada”. Una vez sobrepasado el umbral de disparo, todos los canales de corrientes entrantes se abren y el cambio en el potencial de membrana alcanza su despolarización máxima. Pasado cierto tiempo los canales se inactivan, mientras otros canales se activan y conducen corrientes salientes y la membrana se repolariza nuevamente (Galarraga y Bargas, 1998; Kandel et al., 2000; Hammond, 2001).

Canales de Ca^{2+}

El ion Ca^{2+} juega un papel crucial en la regulación de varias funciones celulares. La concentración intracelular de Ca^{2+} (10^{-7} M) es mucho menor que la concentración externa (1 - 2 mM) y un aumento transitorio en la concentración interna de Ca^{2+} actúa como segundo mensajero en muchos procesos celulares, este incremento es mediado, en su mayoría, por canales de Ca^{2+} (Ashcroft, 2002; Hammond, 2001).

Al igual que los canales de Na^+ , los canales de Ca^{2+} también se pueden encontrar en células excitables. Sin embargo, a diferencia de los canales de Na^+ , la mayoría de los canales de Ca^{2+} no se inactivan rápidamente, así que pueden facilitar una entrada de corriente sostenida para respuestas despolarizantes prolongadas. Además, sirven como vínculo para la traducir la despolarización en las respuestas no eléctricas que son controladas por excitación (Hille, 2001).

El flujo de Ca^{2+} esta mediado principalmente por canales dependientes de voltaje que se activan a potenciales despolarizantes (> -60 mV). Corrientes tipo L, P/Q, N (Tabla 1) (Bargas et al., 1994; Cantrell et al., 1995).

En muchas células, la amplitud de la corriente de calcio (I_{ca}) es regulada por factores externos. En particular, por neurotransmisores, que actúan sobre la modulación de los sistemas intracelulares de segundos mensajeros, que a su vez modulan la función de los canales de Ca^{2+} , de esta forma hay un cambio en las salidas de la célula. La noradrenalina, por ejemplo, incrementa la I_{ca} tipo L en el corazón, y por consiguiente, la fuerza de cada contracción. Esto a su vez, disminuye las I_{ca} tipo N, P/Q y R en muchas terminales nerviosas, por lo tanto la cantidad de neurotransmisor liberado que llega a la siguiente célula (Hille, 2001).

Además de su dependencia de voltaje, los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} se distinguen por su sensibilidad a algunos fármacos, por su conductancia y su cinética de activación.

Algunos canales de Ca^{2+} nombrados de alto umbral de activación (canales de calcio tipos L, N P/Q y R) necesitan grandes despolarizaciones para ser activados, a menudo este tipo de canales carecen de activación lenta (Hille, 2001; Ashcroft, 2002)

Mientras que otros canales necesitan solo pequeñas despolarizaciones para abrirse, llamados también de bajo umbral de activación (canales de calcio tipo T), usualmente este tipo de canales tienen una rápida inactivación y no se observan cuando la célula se mantiene a potenciales despolarizantes (Hagiwara, et al., 1975; Llinás y Sugimori, 1980; Ashcroft, 2002).

Canales Tipo T

Los canales de Ca^{2+} tipo T se activan a potenciales negativos y su inactivación es muy rápida. Están involucrados en generación de la actividad de marcapasos en neuronas y en el músculo cardiaco. Cuentan con una conductancia muy pequeña de 5 pS.

El antagonista del canal tipo T es la Kurtoxina, además se ha reportado que son altamente sensibles al niquel (Ni^{2+}) (Tsien et al., 1991; Dolphin et al., 1990; Randall y Tsien, 1997; Perez-Reyes, 1998; Monteil et al., 2000).

Canales tipo L

Son canales sensibles a las dihidropiridinas (DHPs). Sin embargo tienen una conductancia unitaria de 25 pS. Fueron llamados tipo L por su corriente de larga duración (“long lasting”; Wu y Saggau, 1997). La función más obvia de estos canales es regular la entrada de calcio a células que se contraen o secretan en respuesta a fuertes despolarizaciones (Tsien, et al., 1987; Tsien et al., 1988; Charvet et al., 1994). También son sensibles a las fenilalquilamidas, benzodiazepinas y a la calciseptina (Charvet et al., 1994; Wu, 1997; Budde et al., 1998; Ashcroft, 2002).

La transmisión sináptica no es afectada por DHPs. Sin embargo, los canales tipo L han sido involucrados en la liberación de adrenalina y noradrenalina de las células cromafines de la medula adrenal (Lemos et al., 1989) así como en la modulación presináptica glutamatérgica corticoestriatal (Barral et al., 2001).

En las NEMs, los canales de Ca^{2+} tipo L son necesarios para generar el patrón de disparo característico, para la frecuencia de disparo y el umbral (Perez-Garci, 2003). También se requieren para promover la generación del potencial de meseta (Hernandez-Lopez *et al.*, 1997).

Canal tipo N

Los canales de Ca^{2+} tipo N son activados por fuertes despolarizaciones, se inactivan con mayor velocidad que los tipo L, pero menos rápido que los tipo T (Wu y Saggau, 1997). Tienen una conductancia de 20 pS, son insensibles a DHPs y son bloqueados por ω -Conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) y ω -Conotoxina MVIIC (ω -CgTx MVIIC) (Kasai et al., 1987; Fujita et al., 1993; Stocker et al., 1997; Jones et al., 1997; Angulo et al., 1998; Kaneko et al., 1998; Cox y Dunlap, 1994; Ashcroft, 2002).

Canales tipo P/Q

Los canales de Ca^{2+} tipo P tienen una conductancia de 14 pS, originalmente fueron descritos en células cerebelosas de Purkinje (Llinás et al., 1989). Su cinética de inactivación es lenta, su corriente es resistente a DHPs y ω -CgTx GVIA. Sin embargo, son sensibles a la toxina del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (ω -agatoxina IVA y ω -Agatoxina TK) (Llinás et al., 1989; Ashcroft, 2002; Cherksey et al., 1991; Mintz et al., 1992; Teramoto, 1997; Barral et al., 2001). Posteriormente se identificó en otras regiones cerebrales a otro canal de Ca^{2+} , conocido como Q, que es sensible a las mismas toxinas que el tipo P, pero a concentraciones más altas y cuenta con una conductancia de 19 pS (Wheeler et al., 1994).

La diferencia entre los canales P y Q puede asociarse a la heterogeneidad en la subunidad α_{1A} por proceso alternativo del gen α_{1A} (Bourinet et al., 1999) o diferencias en las subunidades β o $\alpha_{2\delta}$ lo que les confiere propiedades farmacológicas y cinéticas de inactivación y activación diferentes.

Estos 2 tipos de canales están estrechamente involucrados a la liberación de neurotransmisores y se localizan en cuerpos celulares, dendritas y en áreas presinápticas (Llinás et al., 1989, Cherksey et al., 1991; Ashcroft, 2002; Ludwing et al., 1997; Craig et al., 1998; Barral et al., 2001; Sánchez Mejorada et al., 2009).

Canales tipo R

En las neuronas del sistema nervioso central se han descrito corrientes que son resistentes a DHP, ω -AgTx IVA y ω -AgTx TK, ω -CgTx GVIA y ω -CgTx MVIIC y han sido atribuidas a otro tipo de canales, llamados R. Este tipo de canales se caracterizan por tener una conductancia unitaria de 20 pS, se sugiere que son inactivados por voltaje y se bloquean con SNX (extraída del veneno de la tarántula africana *Hysteroocrates gigas*). Se ha reportado que están involucrados en la liberación de neurotransmisores (Smith et al., 1999; Ashcroft, 2002).

Canales	T	L	N	P	Q	R
Corriente	I_T	I_L	I_N	I_P	I_Q	I_R
Conductancia	5-8 pS	25 pS	20 pS	14 pS	19 pS	20 pS
Agonista	--	BayK 8644	--	--	--	--
Antagonista	Kurtoxina	DHPs	ω -Conotoxina GVIA	ω -Agatoxina TK	ω -Agatoxina TK	SNX
Inactivación	Inactivación rápida	Baja inactivación	Moderado rango de inactivación	No inactivante	Moderado rango de inactivación	Moderado rango de inactivación
Información estructural	α_{1G} α_{1H} α_{1L} Se desconocen subunidades auxiliares	α_{1S} , $\alpha_{2\delta}$ β α_{1C} $\alpha_{2\delta}$ γ β α_{1D} $\alpha_{2\delta}$ γ β	α_{1B} $\alpha_{2\delta}$ y β	α_{1A} $\alpha_{2\delta}$ y β	α_{1A} , $\alpha_{2\delta}$, γ , β	α_{1E} $\alpha_{2\delta}$ y β

Tabla 1. Características de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Modificado de Salgado, 2001.

Propiedades moleculares

La subunidad α_1 de los canales de calcio, que es la formadora del poro, es una proteína de 165-175 KDa, cuya secuencia de aminoácidos está organizada en 4 dominios (I a IV), que están conectados por 3 asas intracelulares. El asa entre los dominios I y II tiene sitios de unión para la subunidad β , proteínas G y PKC (Bourinet et al., 1992, Bouron et al., 1995; Strauss et al., 1997). El asa entre los dominios II y III es variable para cada tipo de canal, de la misma forma que el carboxilo terminal (Fig. 4).

Cada dominio tiene 6 segmentos transmembranales (S_1 a S_6). El segmento S_4 está altamente conservado y tiene carga positiva debido a varios residuos de aminoácidos (Argininas y Lisinas). Cuando hay una despolarización el segmento S_4 rota y se produce un cambio en la parte externa; esto favorece el movimiento de los segmentos S_5 y S_6 , que permiten la apertura del canal (Yamaguchi et al., 1999).

Se han clonado genes subunidades individuales; de las cuales se identificaron 10 genes para la subunidad α_1 , 4 para la subunidad β , 4 para el complejo $\alpha_2\delta$ y 8 para la subunidad γ (S, C, D, F, A, B, E, G, H e I) (Hofmann et al., 1999).

Con base en la similitud de su estructura primaria, las subunidades α_1 de los canales HVA se han dividido en 2 grupos: L y no-L (Perez-Reyes y Schneider, 1995).

Los genes S, C, D y F que codifican para los canales tipo L α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} presentan un 75% de identidad con el canal L (α_{1S}) del musculo esquelético. Los genes de la clase C se expresan en el corazón y otros tejidos, mientras que los de la clase D y F en neuronas y células neuroendocrinas.

Los genes de la clase A, B y E que codifican a los canales no-L se expresan principalmente en neuronas (Curtis y Caterall, 1985; Flockerzi et al., 1986; Levitan, 1994).

Las subunidades α_{1a} y α_{1B} expresan las corrientes P/Q- (CaV2.1) y N (CaV2.2), respectivamente, en las NEMs (Cantrell et al., 1995). Las subunidades α_{1C} y α_{1D} dan lugar a las corrientes de tipo L-funcional (CaV1.2; CaV1.3), que son moduladas por la AMPc dependiente de fosforilación (Cantrell et al., 1995).

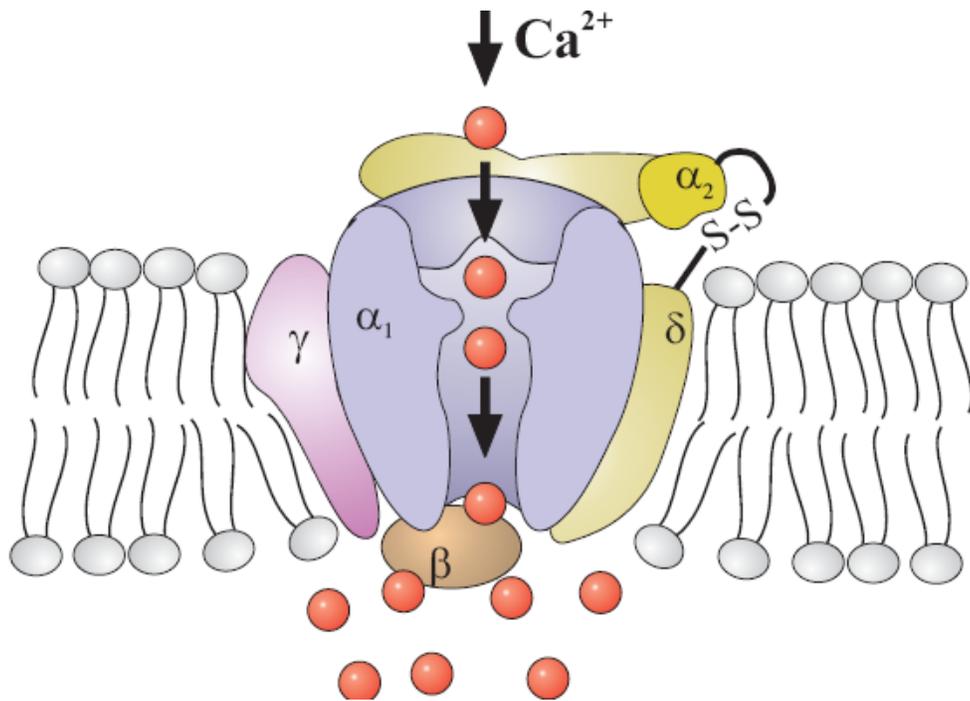


Fig. 4. Esquema de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La subunidad principal α_1 es una proteína transmembranal que forma el conducto del poro, por el cual los iones de Ca^{2+} pasan a través de este a su apertura. La subunidad α_1 es regulada por subunidades complementarias: la subunidad intracelular β , la subunidad transmembranal γ . Y el complejo extracelular de la subunidad α^2 y δ unidas por un puente disulfuro. Tomado de Lacinová, 2005.

Hipótesis de trabajo y justificación

Los mamíferos y las aves se originaron a partir de grupos de reptiles, reportes previos muestran que el circuito sináptico de los GB está conservado en todos los cordados (Reiner et al., 1998) y aunque existan diversas clasificaciones en reptiles, las evidencias indican que las principales funciones de la organización de los GB son las mismas. Por esto, es posible que los GB tengan las mismas poblaciones neuronales; y que estas a su vez, presenten propiedades electrofisiológicas similares. Lo que nos lleva a suponer que las conductancias iónicas sean similares (Barral et al., 2010; Sánchez-Mejorada et al., 2009) aunque quizás mediadas por canales iónicos diferentes.

El conocimiento del origen evolutivo de las propiedades de las células de los GB es de suma importancia desde un punto de vista filogenético y mediante la comparación de los parámetros electrofisiológicos de las células estriatales (la frecuencia de disparo neuronal, patrón de disparo, latencia del potencial de acción, valor del potencial de umbral, identificación de las posibles conductancias iónicas involucradas en la dinámica de la membrana, etc.) podríamos saber si a lo largo de la evolución han existido cambios en los canales que están presentes en la membrana y si han motivaron los cambios funcionales de dichas células.

Sin embargo, no se han estudiado las propiedades electrofisiológicas de las estirpes neuronales de los GB en los reptiles. Los únicos reportes disponibles sobre propiedades electrofisiológicas de esta estructura en reptiles provienen de nuestro laboratorio (Sánchez-Mejorada et al., 2009; Barral et al., 2010)

Tomando en cuenta que las conexiones y circuitos neuronales de los GB están altamente conservados y basándonos en estudios anteriores (Reiner et al., 1998; Marin et al., 1998; Striedter, 1999; Smeets y Reiner, 1994) es posible suponer que los canales de Ca^{2+} de las NEMs de tortuga tengan las mismas funciones en las NEMs de mamífero.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar el papel que tienen los canales de Ca^{2+} sobre el disparo de las NEMs del estriado de la tortuga *Trachemys scripta elegans*.

Objetivos Particulares

- Caracterizar electrofisiológicamente a las NEMs del estriado de la tortuga mediante registros intracelulares de fijación de corriente.
- Identificar la presencia de canales de Ca^{2+} en las NEMs mediante el uso de Cd^{2+} como bloqueador inespecífico.
- Evaluar la participación de distintas conductancias de Ca^{2+} en el disparo aplicando bloqueadores selectivos para los canales L, N y P/Q.

Metodología

La preparación de rebanadas del cerebro de la tortuga ofrece múltiples ventajas para la elaboración de estudios electrofisiológicos, pues en una sola de ellas es posible tener todas las conexiones que el estriado recibe, tanto los núcleos aferentes (corteza) como los núcleos eferentes (globo pálido y sustancia nigra); en esta preparación se pueden realizar registros durante varios días, ya que el cerebro de la tortuga es resistente a la anoxia, además se pueden obtener rebanadas de gran grosor.

Reportes electrofisiológicos previos realizados en diferentes estructuras nerviosas de tortugas, destacan a éstas como grupo representativo de reptiles, lo que favorece la comparación de nuestros resultados con lo observado por otros autores.

Organismos y obtención de rebanadas de cerebro

Para este trabajo se utilizaron tortugas *Trachemys scripta elegans*, adultas, sin distinción de sexo, compradas a proveedores autorizados por SEMARNAT y criadas en condiciones óptimas en el Laboratorio de Herpetología de la FES Iztacala. Las tortugas tuvieron más de 12 cm de longitud del plastrón (Hutchinson, 1992); las cuales fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Posteriormente se decapitaron y se realizó la extracción del cerebro.

Se obtuvieron rebanadas coronales de 300-500 μm de espesor con ayuda de un vibratomo, las rebanadas se sumergieron en solución salina (en mM): 120.0, NaCl; 5.0, KCl; 2.0, MgCl_2 ; 3.0, CaCl_2 ; 15.0, NaHCO_3 ; y 20.0 glucosa, pH 7.6; la solución es saturada con una mezcla de 95% O_2 - 5% CO_2 a 4°C.

Una vez obtenidas las rebanadas, se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo no menor a 60 min. Posteriormente

fueron trasladadas a la cámara de registro, con un flujo constante de solución salina isotónica a una velocidad de la perfusión de 1.5 ± 0.5 ml/min a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Registro Intracelular

Los registros se realizaron en el estriado dorsolateral del cerebro de la tortuga, (paleostriatum augmentatum del atlas de Powers y Reiner, 1980).

Cada neurona fue empalada utilizando microelectrodos previamente llenados con acetato de potasio (3 M) cuya resistencia osciló entre 80 y 150 M Ω . Los registros se obtuvieron con un amplificador de alta impedancia (NeuroData IR-183; Cygnus Technology), en la modalidad de fijación de corriente. A través del electrodo de registro se inyectaron pulsos cuadrados de corriente de diferente duración y amplitud generados por la computadora.

A lo largo de cada experimento, la señal electrofisiológica fue monitoreada en un osciloscopio de rayos catódicos (Tektronix, TDS 2012B). Con la inyección continua de corriente directa se mantuvo el potencial de membrana en los niveles requeridos.

Los registros se digitalizaron y se almacenaron en una PC para su posterior análisis.

Protocolo experimental

Se colocó la punta del electrodo dentro de la solución en la cámara de registro, se aplicó un pulso cuadrado de corriente a través del electrodo compensando y ajustando el puente producido por dicho pulso. Se hizo descender el electrodo en pasos de 1-5 μ m con ayuda de un micromanipulador, al mismo tiempo que se mandaban pulsos cuadrados de corriente.

Una vez obtenido el empale, se aseguró que la neurona no presentara evidencia eléctrica de daño celular y que su patrón de disparo tuviera las características de una NEM (Wilson, 2004). En estas condiciones, el potencial de registro típicamente fue de -76 ± 5 mV ($n = 150$).

Cada experimento constó de una fase control, donde el protocolo de estimulación fue realizado en ausencia de cualquier fármaco agonista o antagonista de canales de Ca^{2+} ; la fase experimental, se realizó posteriormente repitiendo el protocolo de estimulación en presencia de los fármacos añadidos en el medio de perfusión. Permitiendo un recambio total de solución en la cámara de registro.

Para evaluar el efecto de los diferentes bloqueadores de canales de Ca^{2+} sobre el disparo repetitivo de las NEMs se realizaron curvas I/F e I/V en condiciones control y experimental en presencia de los bloqueadores. Todos los fármacos fueron disueltos en soluciones frescas y añadidos al medio de perfusión por separado.

Curvas corriente-voltaje

Las curvas I/V se obtuvieron estimulando a la célula con pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de diferentes intensidades, registrando la respuesta en trazos de voltaje, asimismo con la inyección de corriente directa continua se mantuvo a un potencial de membrana de -80 mV.

Curvas Corriente-Frecuencia

Para determinar los cambios en la frecuencia de disparo, por la aplicación de diversos fármacos se realizaron curvas I/F la célula se estimula con pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades, registrándose la respuesta

también en trazos de voltaje, para este protocolo la célula se mantuvo también a un potencial de membrana de -80 mV.

Fármacos

- Antagonistas de canal de Ca^{2+} tipo N: (1 μM ω -CgTx-GVIA; RBI-sigma St. Louis, MO).
- Antagonistas de canal de Ca^{2+} tipo P/Q: (400 nM ω -AgTx-TK; RBI-sigma St. Louis, MO).
- Antagonistas de canal de Ca^{2+} tipo L (5 μM nifedipina; RBI-sigma St. Louis, MO).
- Agonista de canal de Ca^{2+} tipo L: (5 μM Bay-K 8644; RBI-sigma St. Louis, MO).
- Bloqueador inespecífico de canales de Ca^{2+} : (25 μM Cadmio; RBI-sigma St. Louis, MO).

Análisis de Datos

Todos los registros electrofisiológicos fueron transferidos a una computadora PC, analizados y graficados mediante el programa Origin 7.5 (Origin Lab, USA).

Los resultados obtenidos son pareados, es decir, en cada neurona se comparó la respuesta antes y después a la manipulación experimental (adición de fármacos). Por esta razón se utilizó la prueba de rangos asignados de Wilcoxon de 2 colas (Siegel y Castellan, 1995) y pruebas paramétricas (t de Student). Más de 150 neuronas del neostriado de tortuga fueron registradas para los experimentos mostrados en el presente trabajo, de las cuales 56 se utilizaron para el análisis estadístico. Todas las toxinas fueron disueltas previamente y agregadas al medio de perfusión

Resultados

Todos los registros presentados en el trabajo fueron realizados en NEMs del estriado de tortuga a un potencial de mantenimiento de -80 mV, para cerciorarnos de que todos los canales de Ca^{2+} permanecieran cerrados. En la figura 5 se observa el registro típico de una NEM. Se puede apreciar que después de la aplicación de pulsos cuadrados de corriente, tanto despolarizante como hiperpolarizante, se obtiene la respuesta en voltaje hasta la generación del primer potencial de acción (Fig. 5A) además de las propiedades electrofisiológicas típicas de las NEM de mamífero: el retraso en el disparo característico de las NEMs, la rectificación a pulsos hiperpolarizantes (A), a mayores intensidades del estímulo, trenes de potenciales de acción, con adaptación en el disparo (B). Con los valores obtenidos se construyó la relación curva I/V, como se aprecia en la figura 5C.

Presencia de canales de Ca^{2+} en las NEMs

Existe evidencia de la presencia de conductancias de Ca^{2+} de alto umbral de activación en el neostriado de los mamíferos (Bargas et al., 1991; Bargas, 1994) y en reptiles (Barral et al., 2010). Para comprobar la presencia de los canales de Ca^{2+} en las NEMs de la tortuga utilizamos Cd^{2+} , un bloqueador inespecífico de canales de Ca^{2+} .

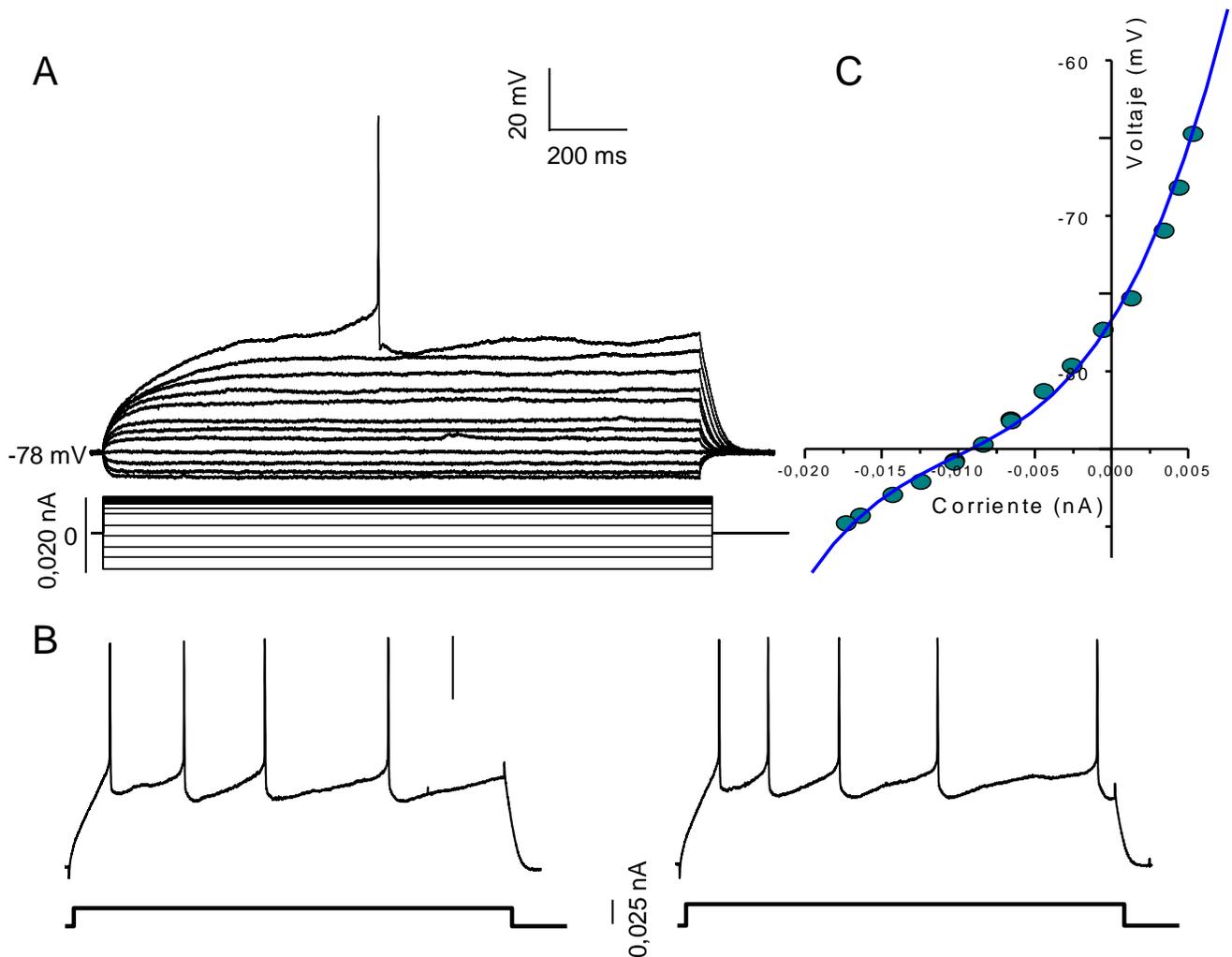


Figura 5. Registro típico de una neurona espinosa mediana en el estriado de tortuga. A; Respuesta en voltaje a diferentes pasos de corriente depolarizantes e hiperpolarizantes aplicados. B; registro de trenes de potenciales de acción evocados por aplicación de corriente intracelular, donde se observa la adaptación en el disparo al aumento en la intensidad del estímulo C; Relación Corriente-Voltaje (de los trazos mostrados en A).

En este trabajo se midieron los cambios de frecuencia de disparo de los potenciales de acción en respuesta al cambio en la intensidad del estímulo, la frecuencia inicial del trazo, (primeros 4 a 5 potenciales de acción) la frecuencia final del trazo (últimos 4 o 5 potenciales de acción), y la frecuencia total (todos los

potenciales de acción de cada trazo). En ese sentido, el efecto de bloquear todos los canales de Ca^{2+} con Cd^{2+} , un bloqueador inespecífico, produjo un incremento paradójico en la frecuencia de disparo. Al bloquear las corrientes entrantes de Ca^{2+} , que despolarizan a la membrana generando disparos repetitivos, esperábamos una disminución en el número de potenciales de acción, sin embargo el Cd^{2+} fue de 13.385 ± 4.659 Hz en el control, a 37.538 ± 7.750 Hz en presencia de cadmio $25 \mu\text{M}$ ($n = 4$, $P < 0.05$, t de Student) (Fig. 6A). En todos los experimentos se observó un incremento de la frecuencia de disparo (Fig. 6B), por lo que en presencia de Cd^{2+} a la mismas intensidades de estimulación que en el control, se obtuvo una frecuencia mayor en la respuesta (Fig. 6C). Las neuronas tienen una frecuencia mayor al inicio de cada tren de potenciales de acción, pero la adaptación en el disparo no se pierde. Además, se aprecia un cambio en el PPH, lo que podría indicar que las conductancias que controlan el PPH están asociadas a la entrada de Ca^{2+} .

Si al aplicar Cd^{2+} tuvimos un incremento en la frecuencia de disparo, efecto contrario al esperado, cabe la posibilidad que cada canal este jugando un papel diferente en la generación de PA y PPH y el efecto observado con Cd^{2+} sea la respuesta conjunta de todos los canales.

El siguiente paso fue saber cuál es la participación individual de cada canal en el disparo.

La función de los canales tipo L

Trabajos previos reportan que en las NEMs los canales de Ca^{2+} tipo L son necesarios para generar el patrón de disparo característico, para la frecuencia de disparo y el umbral (Perez-Garci, 2003). También se requieren para promover la generación del potencial de meseta (Hernandez-Lopez *et al.*, 1997).

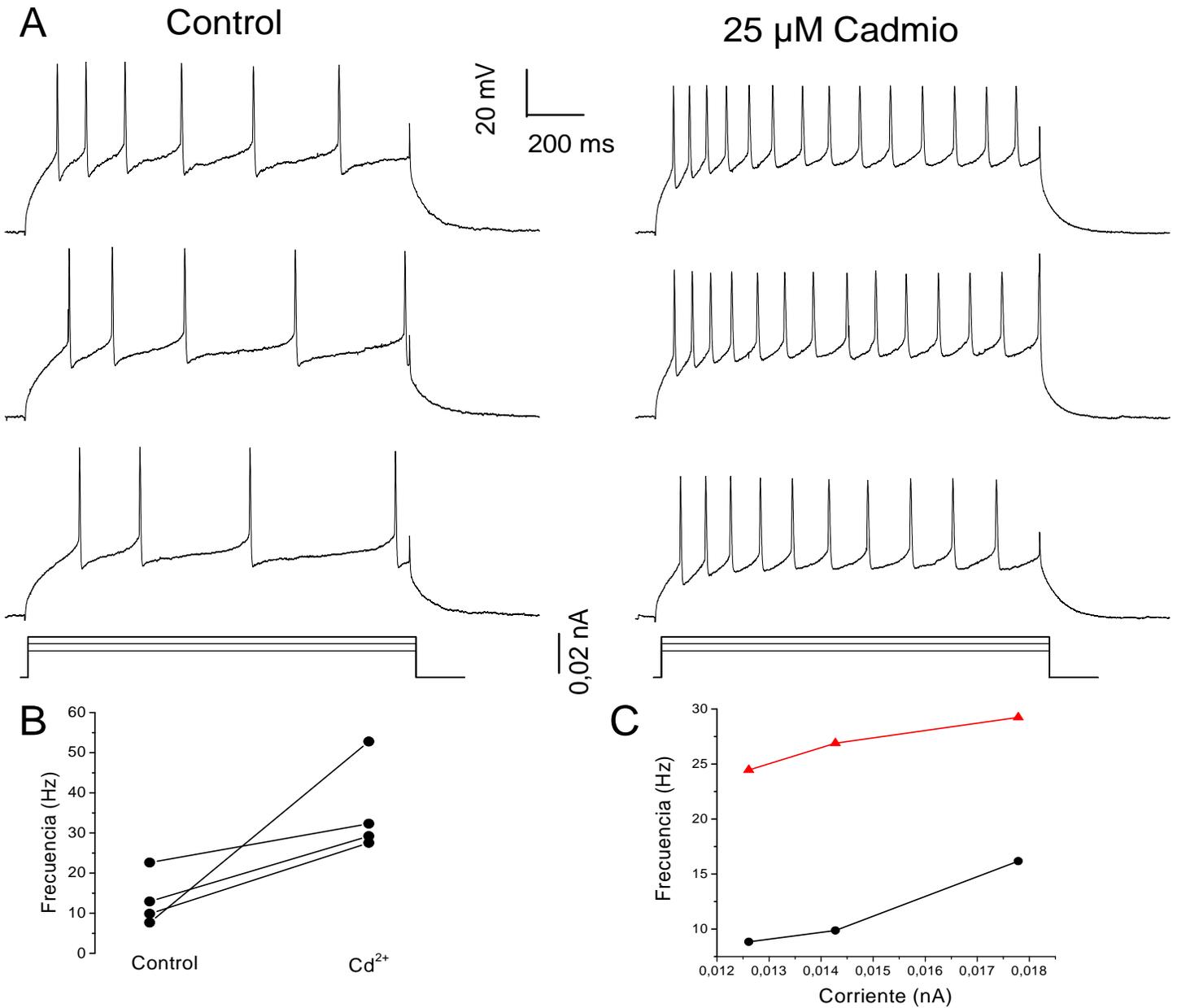


Figura 6. Efecto del Cd^{2+} sobre la frecuencia de disparo de las NEMs. A; Trenes de potenciales de acción generados por pasos de corriente depolarizantes obtenidos en control (izquierda) y después de la aplicación de Cd^{2+} (25 μM) (derecha). La aplicación de 25 μM de Cd^{2+} aumenta la frecuencia de disparo a la misma intensidad de estimulación. Nótese el cambio en el PPH una vez aplicado el Cd^{2+} . B; líneas pares muestran la variación en la frecuencia media con la aplicación de Cd^{2+} (tomadas de C). C; Relación corriente frecuencia (curvas IF) en ambas condiciones, control (●) experimental (▲).

Para este trabajo se utilizó nifedipina (5 μM), que es un bloqueador específico de los canales de Ca^{2+} tipo L y a esa concentración se observa el efecto de bloqueo (Fig. 7). En términos generales la aplicación de nifedipina (5 μM) produce una disminución en la frecuencia de disparo ante estímulos de la misma intensidad (Fig. 7A, C), ya que hubo un cambio de 26.235 ± 6.543 Hz en el control, a 20.070 ± 5.878 Hz en presencia de nifedipina ($n=7$, $P<0.001$, t de Student). Vale la pena hacer notar que el intervalo entre cada potencial de acción mejora presencia del bloqueador de los canales de Ca^{2+} tipo L. Después de la aplicación de nifedipina se necesito mayor intensidad de estimulación para generar trenes de potenciales de acción (Fig. 7B). A diferencia del Cd^{2+} , la nifedipina disminuyó la frecuencia de disparo. Esto podría indicar que la entrada de Ca^{2+} por los canales tipo L está implicado en la generación de mesetas para generar potenciales de acción. No se observan cambios en el PPH en presencia de nifedipina, lo que indica que el Ca^{2+} que entra por estos canales no regula el PPH.

Sí los canales tipo L están involucrados en la generación de mesetas que mantienen a la neurona despolarizada, permitiendo la generación de disparos repetitivos, y a su vez, sí esta despolarización facilita la apertura de otros canales, entonces, la aplicación de un agonista de los canales de Ca^{2+} tipo L, en este caso, el Bay-K 8644 (5 μM), debería producir un incremento en la frecuencia de potenciales de acción.

En 4 de 8 neuronas registradas la frecuencia de disparo en presencia de 5 μM de Bay-K 8644 tuvo un efecto agonista, estos datos concuerdan con reportes previos (Song, W y Surmeier, J, 1996; Flores-Barrera et al., 2011), sin embargo, en 2 de las 4 neuronas el patrón de disparo cambió de un disparo regular con adaptación a mesetas con potenciales de acción en dobletes y tripletes, como se muestra en la figura 8.

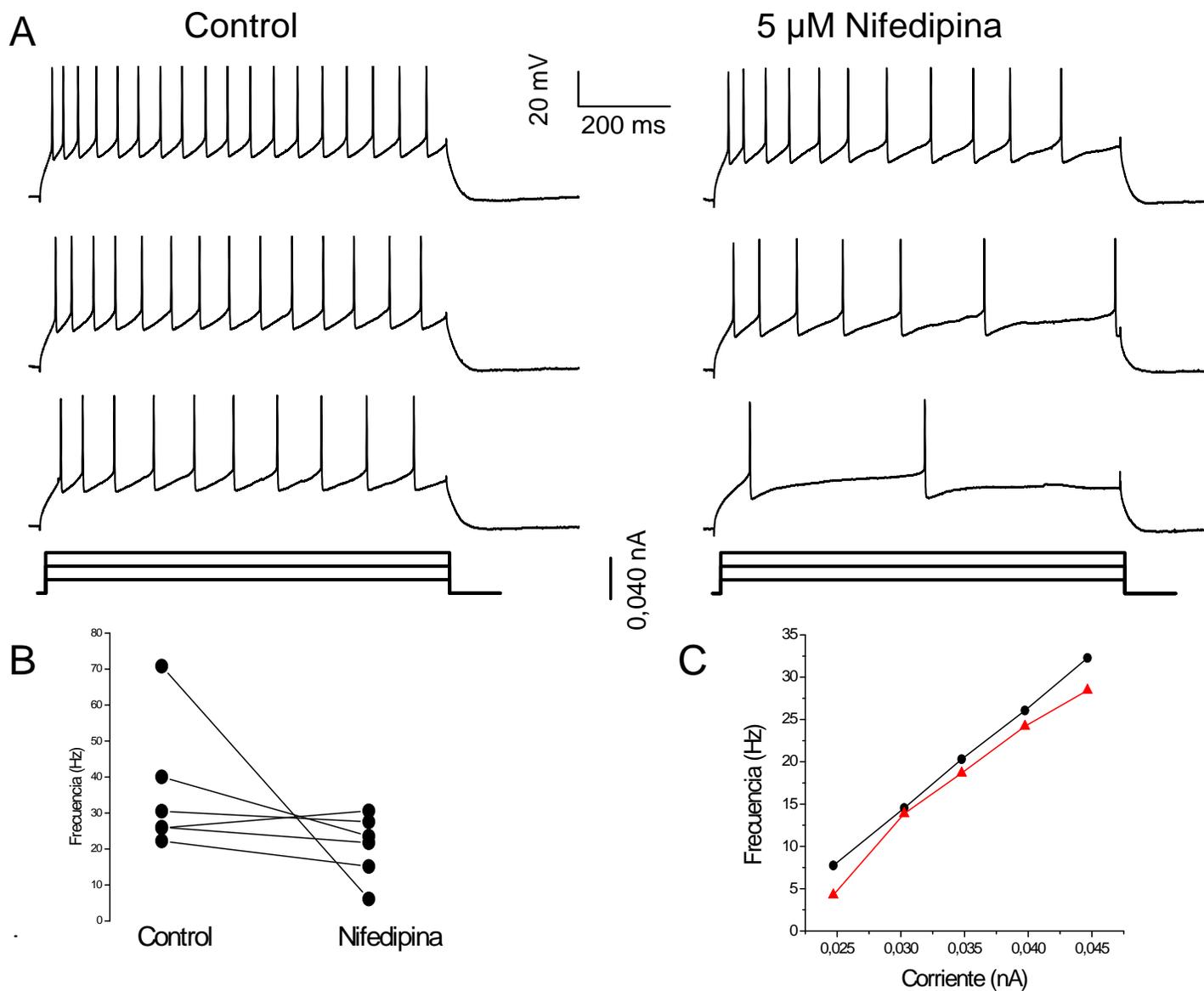


Figura 7. Bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L. Altas frecuencias de disparo en condiciones control (izquierda) y en presencia de nifedipina 5 μ M (derecha). B; líneas pares muestran la variación en la frecuencia media con la aplicación de nifedipina (tomadas de C). C; Relación corriente frecuencia (curvas IF) en ambas condiciones, control (●) experimental (▲). Una vez aplicada la nifedipina, el número de disparos generados a la misma intensidad de corriente disminuye.

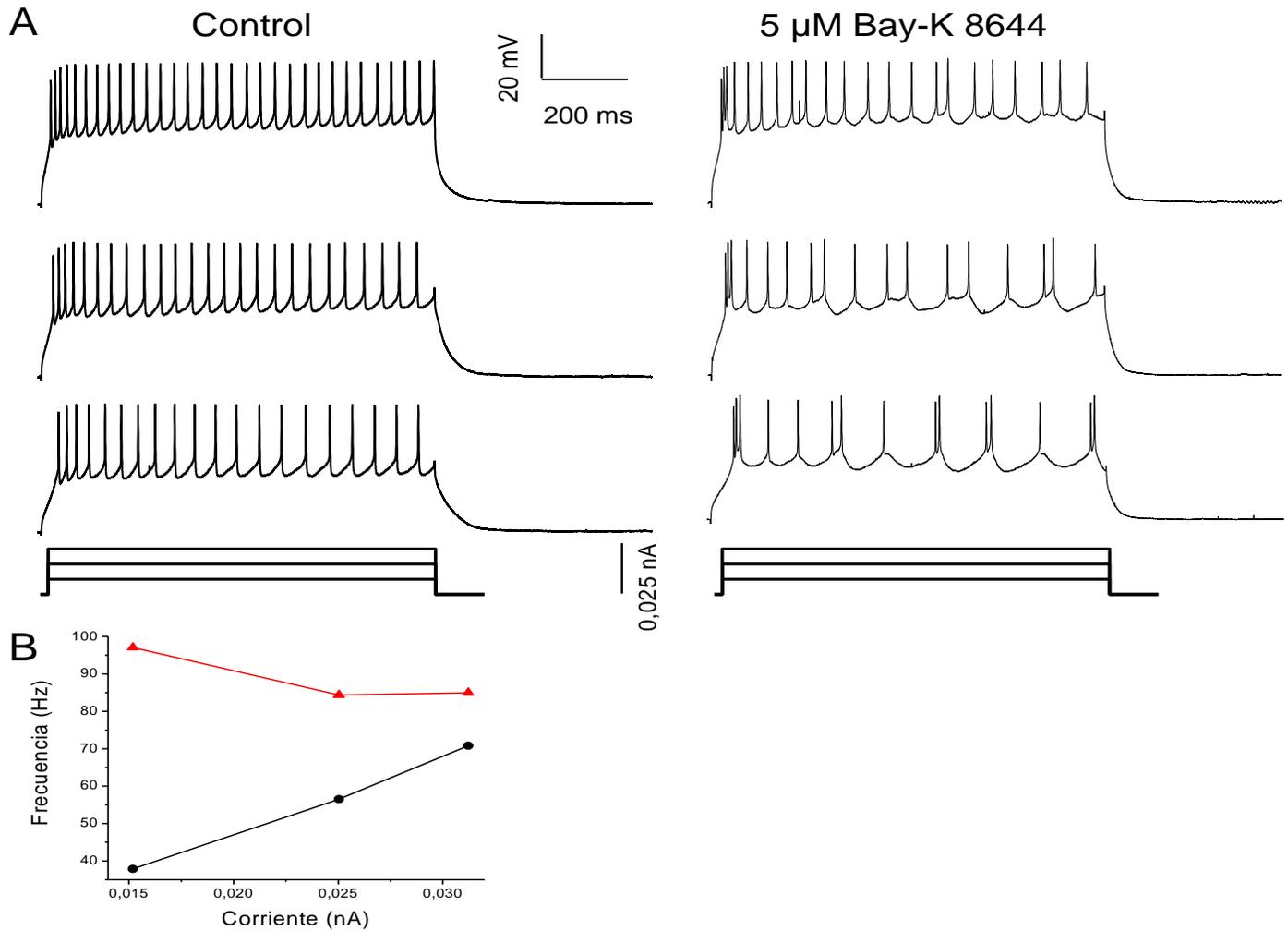


Figura 8. Efecto del Bay-K 8644 sobre los canales de Ca^{2+} tipo L. A; Altas frecuencias de disparo en condiciones control (izquierda) y en presencia de Bay-K 8644 5 μ M (derecha), la formación de tripletes y disparos irregulares una vez aplicada la toxina resulta evidente. B; líneas pares muestran la variación en la frecuencia media con la aplicación de Bay-K 8644. En presencia de Bay-K 8644 el arranque de la neurona fue con una frecuencia mayor a 95 Hz y tripletes, sin embargo conforme la estimulación aumenta, el disparo se vuelve regular y la frecuencia disminuye.

Estos resultados prueban la participación de los canales tipo L en el disparo, ya que mientras la aplicación de nifedipina disminuye la frecuencia de disparo, la adición de Bay-K 8644 facilita la entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona.

El papel de los canales P/Q y N en la frecuencia de disparo

Reportes previos resaltan la importancia de los canales tipo P/Q y N, ya que las corrientes que pasan a través de ellos están asociadas a la frecuencia de disparo, además de activar corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} asociadas al PPH (Storm, 1993; Pineda et al., 1992, Perez-Garci et al., 2003; Vilchis et al., 2000). Por lo que se decidió bloquear los canales N y P/Q para determinar si la frecuencia de disparo en las NEMs de tortuga se ve alterada por estas conductancias.

Para bloquear los canales de Ca^{2+} tipo N se agregó ω -CgTx-GVIA (1 μ M) a la solución externa. Se observó que la aplicación de esta toxina produjo una disminución en las mesetas que se obtienen al mandar estímulos cuadrados de corriente y no en la generación de potenciales de acción, lo que también afectó la frecuencia de disparo. Condición control 22.295 ± 2.347 , mientras que en presencia de ω -CgTx-GVIA la frecuencia cambió a 20.283 ± 2.021 ($n = 6$, NS, t de Student, Fig. 9). Ninguna de las neuronas registradas perdió sus características electrofisiológicas, sin embargo, en 5 de 6 registros se necesitó una intensidad de corriente mayor que la requerida para obtener una similar a la observada en el control.

Por otro lado, cuando bloqueamos los canales de Ca^{2+} tipo P/Q con ω -agatoxina TK (ω -AgTx TK 400 nM), se observó que la frecuencia aumentó de 9.007 ± 3.485 Hz en el control, a una frecuencia de 25.840 ± 6.706 Hz ($n=4$, $P=0.05$ t de Student). Estos datos sugieren que los canales P/Q actúan directamente sobre la frecuencia de disparo (Fig. 10). Cabe destacar que el PPH no se vio afectado en presencia de ambas toxinas. Esto difiere con los reportes previos; ya que se ha probado que el Ca^{2+} que pasa por estos canales regula el PPH (Pineda et al., 1992, Perez-Garci et al., 2003).

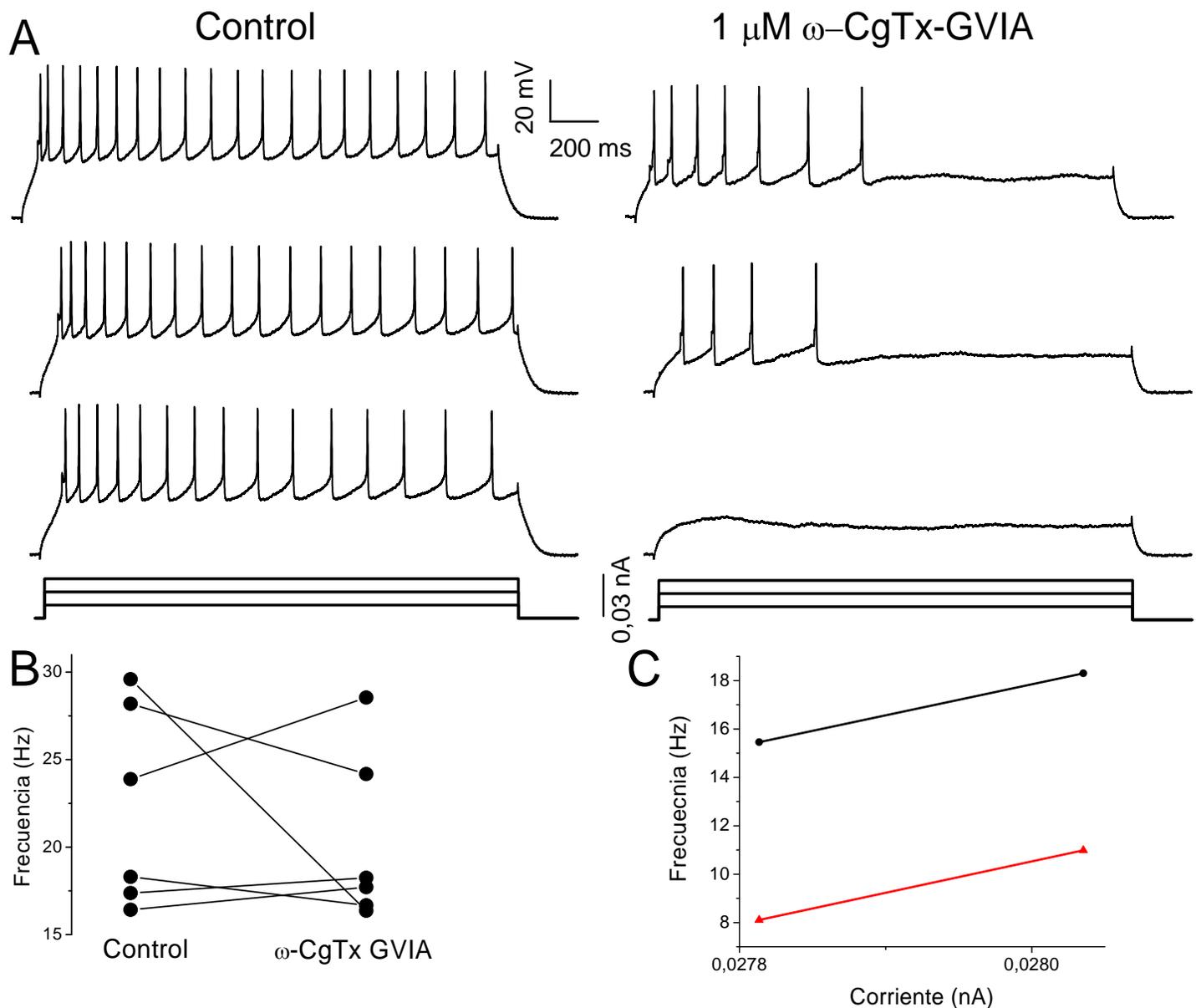


Fig. 9. Bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo N. A; Trenches de potenciales de acción generados por pasos de corriente depolarizantes obtenidos en control (izquierda) y en presencia de 1 μM de $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ (derecha). La respuesta a la misma intensidad de estímulo una vez agregada la $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ es menor, indicando una menor entrada de Ca^{2+} y por consiguiente una menor despolarización. B; líneas pares muestran la variación en la frecuencia media con la aplicación de $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ (tomadas de C). C; Relación corriente frecuencia (curvas IF) en ambas condiciones, control (●) experimental (▲).

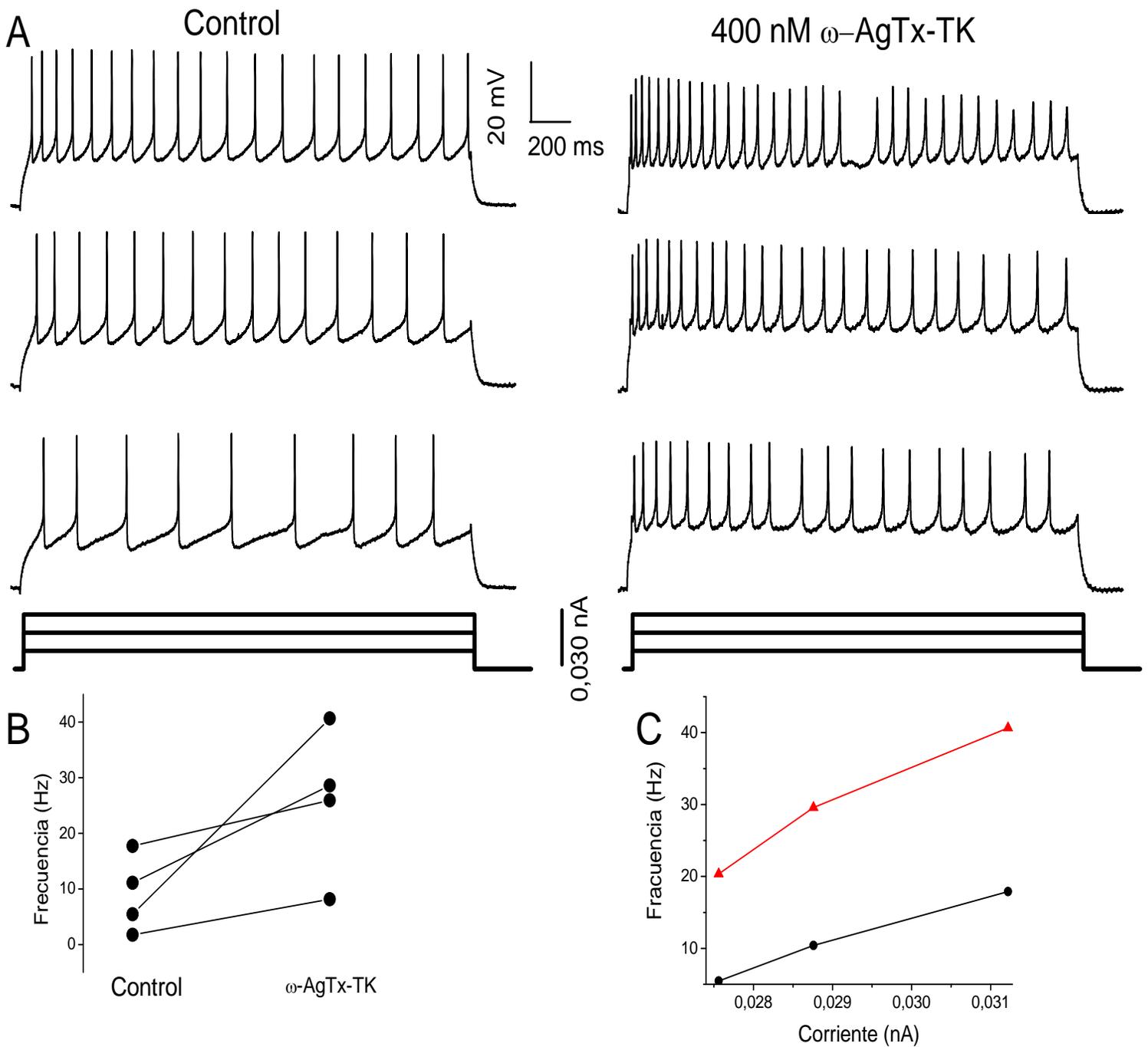


Figura 10. Papel de los canales P/Q sobre la frecuencia de disparo. Trenes de potenciales de acción generados por pulsos cuadrados de corriente depolarizantes obtenidos en control (izquierda) y en presencia de 400 nM de ω -AgaTx-TK (derecha), nótese el incremento en la frecuencia de disparo. B; líneas pares muestran la variación en la frecuencia media con la aplicación de ω -AgaTx-TK (tomadas de C). C; Relación corriente frecuencia (curvas IF) en ambas condiciones, control (●) experimental (▲).

Sin embargo, aún con el bloqueo de los canales tipo L, N y P/Q la entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona resulta notorio. Esto podría sugerir la presencia de otro tipo de conductancia de Ca^{2+} , probablemente canales tipo R, reportados previamente en las NEMs (Bargas et al., 1991; Foehring et al., 2000; Perez-Reyes, 2003; Foehring et al., 2000) o canales tipo T (Bargas et al., 1994; Bourinet et al., 1996; Soong et al., 1993)

Discusión

En este trabajo nos preguntamos si en la transición de reptiles a mamíferos, los canales de Ca^{2+} participan en la generación del potencial de acción de la misma forma; para ello se realizaron bloqueos selectivos de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} .

Los experimentos realizados confirmaron la presencia de los canales de Ca^{2+} en las NEMs de tortuga y su participación en el disparo. Sin embargo, el comportamiento de algunos de estos canales difiere a lo reportado en mamíferos. Y aunque los canales de Ca^{2+} están presentes en las neuronas de la tortuga, el papel que desempeñan en el disparo es diferente.

Una vez que aplicamos Cd^{2+} (25 μM) la frecuencia de disparo aumento de forma significativa, lo que nos hace suponer que este, impide la entrada de Ca^{2+} que activa las conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} ; particularmente, a las conductancias de K^+ tipo "SK", que están involucradas en la generación del PPH y se activan con concentraciones de 100 a 400 nM de Ca^{2+} y dependen del flujo de Ca^{2+} al interior de la neurona (Pankaj, 1996). La entrada de Ca^{2+} que es bloqueada por el Cd^{2+} evita la repolarización de la membrana; por lo que el potencial de membrana permanece más tiempo cerca del umbral de disparo, aumentando así la frecuencia de disparo. Sin duda, los experimentos sugieren, indirectamente, la dependencia de los canales de K^+ a la entrada de Ca^{2+} . La aplicación de toxinas específicas para los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} ,

aunado al estudio individual de las corrientes de Ca^{2+} en las NEMs de tortuga sería necesaria para poder confirmar lo reportado en este trabajo.

El efecto del Cd^{2+} disminuyó la adaptación en del disparo, pero no la eliminó (ver Figura 6), Pineda et al., 1992; Galarraga et al., 1989; Bargas, 1994, Perez-Garci, 2003).

Es conocido el papel que juegan los canales tipo L en el disparo en las NEMs de mamífero. Sin embargo, el papel de los canales tipo L en el disparo repetitivo de las NEMs de tortuga podría ser contradictorio.

A la aplicación de nifedipina (5 μM), concentración necesaria para producir el bloqueo de estos canales, se necesito una mayor intensidad de corriente para generar un tren de potenciales de acción. Nuestros datos sugieren que la nifedipina está afectando directamente a las corrientes entrantes persistentes que se encargan de mantener el potencial de membrana próximo al umbral de disparo; lo que impediría la generación del disparo repetitivo, y por consiguiente, el potencial de membrana permanece alejado del umbral de disparo. Es de mucha importancia hacer notar que los resultados tuvieron un efecto contrario al producido con Cd^{2+} . Por lo que el papel que desempeñan los canales tipo L en la generación de mesetas en las NEMs de tortuga resulta similar a lo que sucede en los mamíferos con estos mismos canales.

Por otro lado, la aplicación de 5 μM de Bay-K 8644, agonista de canales L, cambió el patrón de disparo regular a mesetas con dobletes y tripletes de potenciales de acción (Fig. 8). Esto puede deberse a que su apertura esté fuertemente ligada a las aferencias que reciben. Por ejemplo, es bien sabido que los canales tipo L son modulados por dopamina (Hernández-López et al., 1997), por lo que la presencia de receptores dopaminérgicos tipos D1 y D2 podría ser la causa más próxima a las diferentes respuestas presentadas en las NEMs de tortuga, ya que tienen influencia directa sobre los canales tipo L (Barral et al., 2010). El receptor D1 permite la apertura de los canales L, mientras que el receptor D2 los cierra (Barral et al., 2010; Cepeda et al., 1993; Levine et al., 1996; Flores-Hernández et al., 2002; Nicola et al., 2000).

Se ha encontrado que en cierto número de neuronas, los potenciales de meseta y oscilaciones de voltaje son generados por receptores NMDA dependientes de canales tipo L. (Seamans et al., 1997; Schiler y Shuller, 2001). Además, las oscilaciones de voltaje y los potenciales de mesetas generadas por estimulación cortical son dependientes de canales tipo L y la aplicación de Bay-K 8644 mejora la duración y la frecuencia de estas (Vergara et al., 2003).

Otra opción de este tipo de respuesta puede ser la influencia que tienen las interneuronas en la regulación de las NEMs. Las interneuronas representan el 5% de la población del NE en mamíferos (Bennett y Wilson, 2000) y en muchos casos conectan entre sí a las NEMs, por lo que la comunicación entre estas neuronas podría ser otro factor determinante en la función de los canales tipo L.

En mamíferos, los canales tipo P/Q y N están asociados a la frecuencia de disparo, además activan corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} asociadas al PPH (Storm, 1993; Pineda et al., 1992, Perez-Garci et al., 2003; Vilchis et al., 2000). Sin embargo, en las NEMs de tortugas, la aplicación de ω -CgTx GVIA (1 μ M) afectó a la meseta a la que se producen los potenciales de acción y no en la frecuencia de disparo, ya que no hubo cambios en la frecuencia de disparo. Aun más, se necesito 3 veces más intensidad de la corriente inyectada en las neuronas para generar la respuesta.

En reportes previos la aplicación de ω - CgTx GVIA en NEM de mamífero no afecta de forma significativa la respuesta de las neuronas (Perez-Garci et al., 2003). Esto indica que el papel de los canales tipo N en las NEMs de tortuga está involucrado con la regulación de las mesetas, función que en los mamíferos es realizada, al parecer, solo por los canales tipo L (Pineda et al., 1992, Perez-Garci et al., 2003). Aunado a esto, el Ca^{2+} que entra a través de los canales tipo N tiene una participación directa en la generación de potenciales de acción.

La notoria disminución de Ca^{2+} una vez aplicada la toxina, además del cambio en la meseta, sugiere que el Ca^{2+} que entra por los canales tipo N es una de las principales fuentes de este ión al interior de la célula. Estudios en NEMs de

rata muestran una reducción del 53 % de la entrada de Ca^{2+} a la neurona cuando se aplica 1 μM de $\omega\text{-CgTx GVIA}$ (Vilchis et al., 2000).

Reportes previos muestran que los canales P/Q y N en conjunto regulan la frecuencia de disparo en NEMs de mamífero (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003), sin embargo la aplicación de $\omega\text{-AgTx TK}$ (400 nM) aumentó la frecuencia de disparo de forma significativa. Mostrando que son los canales P/Q los que actúan directamente sobre la frecuencia de disparo y no como se había reportado previamente en mamíferos. El PPH solo es afecto en presencia de Cd^{2+} y no con el resto de las toxinas.

Se ha reportado que en varios tipos de células, el flujo de Ca^{2+} que entra por los canales tipo N activa los canales SK_{Ca} . Esto indicaría que, anatómicamente, los canales tipo N están próximos a los canales SK_{Ca} en neuronas que tienen una corriente I_{PPH} (Sah P, 1995; Viana et al., 1993). Sin embargo en las NEMs de tortugas, el PPH que sigue a un tren de disparo cambió solo al aplicar Cd^{2+} .

De la misma forma que en otros trabajos (Foehring et al., 2000) aun con el bloqueo selectivo de los canales L, N y P/Q, se pudo observar la entrada de Ca^{2+} a la neurona; sugiriendo la presencia de otro tipo de conductancias de Ca^{2+} que también estaba participando en el disparo.

Es bien sabido que los canales tipo T (canales de bajo umbral, ver introducción) están presentes en las NEMs (Bargas et al., 1994; Bourinet et al., 1996; Soong et al., 1993). Por otra parte, la subunidad $\alpha 1\text{E}$ asociadas a las conductancias tipo R (Ludwig et al., 1997; Williams et al., 1994; Foehring et al., 2000) esta expresada en NEMs.

Por lo anterior, es importante hacer notar la participación de otra conductancia de Ca^{2+} en el disparo de las NEMs de tortuga. Por lo que el siguiente paso de esta investigación seria continuar con el bloqueo selectivo de los canales R y T para saber si están involucrados en el disparo de las NEMs de tortuga.

Los resultados mostrados en este trabajo indican que algunos canales presentan una función diferente con respecto a reportes previos en neuronas de

mamíferos. Para poder ratificar estas afirmaciones es de suma importancia el estudio de de las corrientes individuales de Ca^{2+} en las NEMs. Esto permitirá saber cuál es el papel individual de cada corriente de Ca^{2+} .

Conclusiones

- En este trabajo se confirma la presencia de canales de Ca^{2+} en las NEMs de la tortuga.
- El papel individual que desempeña cada tipo de canal de Ca^{2+} en el disparo repetitivo difiere con lo reportado previamente en mamíferos.
- El papel de los canales de Ca^{2+} tipo L está involucrado en la generación de mesetas, sin embargo, su apertura podría estar ligada a las aferencias que reciben.
- El Ca^{2+} que entra por los canales tipo N participa en el cambio de la meseta a la que se producen los potenciales de acción y no en la regulación en la frecuencia de disparo.
- Son los canales P/Q los que actúan directamente sobre la frecuencia de disparo y no en conjunto con los canales tipo N.

Referencias

- 1.- Adams PR. 1982. Voltage dependent conductances of vertebrate neurons. *TINS*, 5: 116-119.
- 2.- Adams PR. Galvan M. 1986. Voltage dependent conductances of vertebrate neurons and their role in membrane excitability. *Advances in Neurology* vol. 44, Raven press, NY.
- 3.- Anglade I., Mazurais D., Dourad V., Jossic-Corcós C., Mananos EL., Michel D., Kah O. 1999. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 410: 227-289.
- 4.- Angulo MC, Parra P., Dieudonné S. 1998. Chick cerebellar Purkinje cells express ω -Conotoxin GVIA-sensitive rather than funnel-web spider toxin-sensitive calcium channels. *Neuroscience* Mar 83:1 1-6.
- 5.- Ariëns-Kappers CU., Huber GC., Crosby E. 1936. *The Comparative Anatomy of the Nervous System of vertebrates. Including Man.* New York: Hafner Press.
- 6.- Ashcroft, M. 2002. *Ion Channels and Disease.* University laboratory of physiology. Oxford, U.S.
- 7.- Auclair F., Lund JP., Dubuc R. 2004. Immunohistochemical distribution of tachykinins in the CNS of the lamprey *Petromyzon marinus*. *J comp Neurol* 479: 328-346.
- 8.- Baldissera F., Gustaffson B., Paronigiani F. 1973. Adaptation in a simple neuron model compared to that of spinal motoneuron. *Brain Res.* 52: 382-384.
- 9.- Bargas J., Galarraga E. and Aceves J. 1991. Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res.* 539, 158–163.

- 10.- Bargas J., Howe A., Eberwine J., Chao Y., Summeier DJ. 1994. Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* Nov 14:11 Pt 1 667-86.
- 11.- Bargas J, Galárraga E y Aceves J. 1998. Los ganglios basales. En: *Fisiología, células, órganos y sistemas*. Vol. 5 Cap X.13. Muñoz, E. J. y X García (Eds.) FCE. México. pp 257-273.
- 12.- Barral, J. 2001. Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatergicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. UNAM. Facultad de ciencias. Izcala. México DF. Pp 82.
- 13.- Barral J., Galarraga E., Tapia D. Flores-Barrera E., Reyes A., Bargas J. 2010. Dopaminergic Modulation of Spiny Neurons in the Turtle Striatum. *Cell Mol Neurobiol* 30:743–750.
- 14.- Barrett EF., Barrett JN. 1976. Separation of two voltage sensitive potassium current and demonstration of tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneuron. *J Physiol London*. 255: 735-774.
- 15.- Batten TFC., Cambre ML., Moons L., Vandesande F. 1990. Comparative distribution of neuropéptido-immunoreactive system in the brain of the green molly *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol* 302: 893-919.
- 16.- Belluzzi O., Sacchi O., Wanke E. 1985. Fast transient outward current in the rat sympathetic neurons studies under voltage clamp conditions. *J Physiol* 358: 91-108.
- 17.- Bennett BD y Wilson CJ. 2000. Synaptology and physiology of neostriatal neurons. *Brain dynamics and striatal complex*, eds. Miller R y Wickens JR, pp 111-140. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- 18.- Bishop GA., Chang HT., Kitai ST. 1982. Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in rat. *Neuroscience* 7: 179-191.

- 19.- Bourinet E., Fournier F., Nargeot J., Charnet P. 1992. Endogenous Xenopus-oocyte Ca-channels are regulated by protein kinase A and C. *FEBS Lett* Mar 24 299:1 5-9.
- 20.- Bourinet E, Zamponi GW, Stea A, Soong TW, Lewis BA, Jones LP, Yue DT, Snutch TP. 1996. The $\alpha 1E$ calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J Neurosci* 16: 4983–4993.
- 21.- Bourinet E., Soong TW., Sutton K., Slaymarker S., Mathews E., Monteil A., Zamponi GW., Nargeot J., Snutch TP. 1999. Splicing of α_{1A} gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* May 2:5 407-15.
- 22.- Bouron A., Soldatov NM., Reuter. 1995. The $\beta 1$ subunit is essential for modulation by protein kinase C of an human and non-human L-type Ca^{2+} . *FEBS* 377:2 19-24.
- 23.- Budde T., Munsch T., Pape HC. 1998. Distribution of L-type calcium channels in rat thalamic neurons. *Eur J Neurosci* Feb 10:2 586-97.
- 24.- Calvin HW., Schwindt PC. 1972. Steps in production of motoneuron spikes during rhythmic firing. *J Neurophysiol.* 35: 297-310.
- 25.- Cantrell AR, Carter-Russell H, Mermelstein P and Surmeier DJ. 1995. Ca^{2+} and Na^{+} currents in acutely-isolated neostriatal neurons from the rat. In: Ariano M and Surmeier DJ, eds. *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function* Austin TX: NIU, Springer-Verlag; pp 151–163.
- 26.- Carrera I., Ferreiro-Galve S., Sueiro C., Anadon R., Rodriguez-Moldez I. 2008. Tangentially migrating GABAergic cells of subpallial origin invade massively the pallidum in developing sharks. *Brain Res Bull* 75: 405-409.
- 27.- Cepeda C., Buchwald NA., Levine MS. 1993. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtype activated. *Proc Natl Acad Sci* 90, 9576-9580.

- 28.- Charmet P., Bourinet E., Dubel SJ., Snutch TP., Nargeot J. 1994. Calcium currents recorded from a neuronal alpha 1C L-type calcium channel in *Xenopus oocytes*. FEBS Lett May 9 344:1 87-90.
- 29.- Cherksey BD., Sugimori M., Llinás RR. 1991. Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. Ann N Y Acad Sci 635: 80-9.
- 30.- Chiappe LM. 1995. The first 85 million years of avian evolution. Nature 378: 349-355.
- 31.- Connors JA., Gutnick MJ., Prince DA. 1982. Electrophysiological properties of neurocortical neurons in vitro. J. Neurophysiol 8: 1302-1335.
- 32.- Cox DH., Dunlap K. 1994. Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. J Gen Physiol 104:2 311-336.
- 33.- Craig PJ., McAnish AD., McComack AL., Smith W., Beattie RE., Priestley JV., Yip JL., Averill S., Longbottom ER., Volsen SG. 1998. Distribution of the voltage-dependent calcium channels α_{1A} subunit throughout the mature rat brain and its relationship to neurotransmitter pathway. J Comp Neurol 397:2 251-67.
- 34.- Curtis BM., Catterall WA. 1985. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by Camp-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci USA 82:8 2528-32.
- 35.- DiFiglia M., Pasik P., Pasik T. 1976. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. Brain Res 114: 245-256.
- 36.- Dodson, P.D. y Forsythe I.D. 2004. Presynaptic K^+ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. TRENDS in Neuroscience 27(4) 220-217.
- 37.- Dolphin Ac., Huston E., Scott RH. 1990. Direct and indirect modulation of neuronal calcium currents by G-protein activation. Biochem Soc Symp 56 45-60.

- 38.- Edinger , L., Wallenberg, A., Holmes GM. 1903. Untersuchungen über die vergleichende Anatomie des Gehirns. 3. Das Vorderhirn der Vögel. Abhand 1.d. Senekenberate Gesellschaft. Frankfurt am Main 20: 343-426.
- 39.- Ferreiro-Galve S., Carrera I., Candal E., Villar-Cheda B., Anadon R., Mazan S., Rodriguez-Moldes I. 2008. The segmental organization of the developing shark brain based on neurochemical marker, with special attention to the prosencephalon. *Brain Res Bull* 75 236-240.
- 40.- Flockerzi V., Oeken HJ., Hofmann F. 1986. Purification of a functional receptor for calcium channel blockers in neocortical and neostriatal neurons. *J Neurosci*.
- 41.- Flores-Barrera E., Vizcarra-Chacón J., Bargas J., Tapia, D., Galarraga, E. 2011. Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci*
- 42.- Flores-Hernández J., Cepeda C., Hernández-Echeagaray E., Calvert CR., Jokel ES., Fienberg AA., Greengard P., Levine MS. 2002. Dopamine enhancement of NMDA current in dissociated médium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88, 3010-3020.
- 43.- Foehring RC., Schwindt PC., Crill WE. 1989. Norepinephrine selectively slow Ca^{2+} and Na-mediated K^+ currents in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol*. 61: 245-256.
- 44.- Foehring R, Mermelstein P, Song W, Ulrich S, Surmeier J. 2000. Unique Properties of R-Type Calcium Currents in Neocortical and Neostriatal Neurons. *J Neurophysiol* 84:2225-2236
- 45.- Fujita Y., Mynlieff M., Dirksen RT., Kim MS., Niidome T., Nakai J., Friedrich T., Iwabe N., Miyata T., Furuichi T. 1993. Primary structure and

- functional expression of ω -conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron* 10:4 585-98.
- 46.- Galarraga E., Bargas J., Sierra A., Aceves J. 1989. The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* 75: 157-168.
- 47.- Galarraga E. y Bargas, J. 1998 Multiplicidad de conductancias iónicas en las células excitable. V. 1, Pp 149-166.
- 48.- Gauthier J., Kluge AJ., Rowe T. 1988. Amniote phylogeny and the importance of fossils. *Cladistics* 4:105-209.
- 49.- Goh JW., Pennefather PS. 1987. Pharmacological and physiological properties of after-hyperpolarization current of bullfrog ganglion neurons. *J Physiol London.* 394: 315-330.
- 50.- González A., Smeets WJAJ. 1991. Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *J Comp Neurol* 303: 457-477.
- 51.- Gorman ALF., Thomas MV. 1980. Potassium conductance and internal calcium accumulation in a molluscan neurone. *J Physiol London* 308: 287-313.
- 52.- Grillner S., Cangiano L., Hu GY.,Thompson R., Hill R., Wallen P. 2000. The intrinsic function of a motor system – from ion channels to network and behaviour. *Brain Res* 886: 224-236.
- 53.- Groenewegen H. 2003 *The Basal Ganglia and Motor Control*. Department of Anatomy, Research Institute Neurosciences Vrije Universiteit, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.
- 54.- Hagiwara, S., Osawa S. and Sand O. 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. gen. Physiol.* 65: 617-644.

- 55.- Hammond, C. 2001. Cellular and Molecular Neurobiology 2^a ed. Academic Press. San Diego California. pp 493.
- 56.- Haylett D., Jenkinson D. 1990. Potassium channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic potential (cook, N.S., ed) 71-95.
- 57.- Hernández-López S., Bargas J., Surmeier DJ., Reyes A., Galarraga E. 1997. D1 receptors activation enhances evoked discharge in neostriatal médium spiny neurons by modulating an L-Type Ca^{2+} conductance. J Neurosci 17: 3334-33342.
- 58.- Hille B. 1992. G-protein-couple mechanisms and nervous signaling. Neuron. 9: 187-195.
- 59.- Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA: Sinauer.
- 60.- Hodgking A y Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. London 117: 500-544.
- 61.- Hofmann F., Lacinová L., Klugbauer N. 1999. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 139, 33-87.
- 62.- Inagaki S., Senba E., Shiosaka S., Takagi H., Kawai Y., Takatsuki K., Sakanaka M., Matsuzaki T., Tohyama M. 1981a. Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in frog brain and spinal cord: immunohistochemical analysis. J Comp Neurol 201: 243-254.
- 63.- Jones OT., Bernstein GM., Jones EJ., Jungloff DG., Law M., Wong W., Mills RL. 1997. N-type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex and regional expression. J Neurosci 17:16 6152-64
- 64.- Kandel, E.R.; J.H. Schwartz y T.M. Jessell 2000. Principles of Neural Science. 4a Ed. McGraw-Hill USA. pp 175-298

- 65.- Kaneko S., Akaike A., Satoh M. 1998. Differential regulation of N- and Q-type Ca²⁺ channels by cyclic nucleotides and G-proteins. *Life Sci* 62:17-18 1543-7
- 66.- Kapsimali M, Vidal B., González A., Dufour S., Vernier P. 2000. Distribution of mRNA encoding the four dopamine D1 receptor subtypes in the brain of the European eel *Aguilla aguilla*: Comparative approach to the function of D1 receptors in vertebrates. *J Comp Neurol* 419: 320- 343.
- 67.- Kasai H., Aosaki T., Fukuda J. 1987. Presynaptic Ca-antagonist ω -conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci Res* 4:3 228-35.
- 68.- Kawaguchi, T. 1993. Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13: 4908-4923.
- 69.- Kita H., Kitai ST. 1993. GABAergic circuits of striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72
- 70.- Kuba K. 1980. Release of calcium ions linked to the activation of potassium conductance in a caffeine-treated sympathetic neurone. *J Physiol.* 298: 251-269.
- 71.- Lacinová L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 1:1-78.
- 72.- Lancaster B., Adams PR. 1986. Calcium-dependent current generating the after-hyperpolarization of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 55: 1268-1292.
- 73.- Lancaster B., Nicoll RA. 1987. Properties of two calcium-activated hyperpolarization in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 389: 187-203.
- 74.- Lee MSY. 1993. The origin of the turtle body plan: Bridging and famous morphological gap. *Science* 261:1716-1720.
- 75.- Lee MSY. 1997. Reptile relationships turn turtle. *Nature* 389: 245-246.

- 76.- Lemos JR., Ocorr KA., Nordmann JJ. 1989. Possible role for ionic channels in neurosecretory granules of rat neurohypophysis. *Soc Gen Physiol Ser* 44: 333-47.
- 77.- Levine MS., Li Z., Cepeda C., Cromwell HC y Altemus KL. 1996. Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse* 24, 65-78.
- 78.- Levitan IB. 1994. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and desphosphorylation. *Annu Rev Physiol* 56 193-212
- 79.- Llinás, R. and Sugimori M. 1980. Electrophysiological properties of in vitro purkinje cells dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond)* 305: 197-213.
- 80.- Llinás RR., Sugimori M., Cherksey B. 1989. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channels. *Ann NY Acad Sci* 560: 103-111.
- 81.- Salgado H. 2001. Caracterización biofísica y farmacológica de los canales de calcio de neuronas disociadas del estriado de rata. Tesis para obtener el título de Biólogo. FES-Iztacala, UNAM. Tlanepantla Edo. Mex. México.
- 82.- Lorenzon NM., Foehring RC. 1992. Relationship between repetitive firing and after-hyperpolarization in human neurocortical neurons. *J Neurophysiol* 67: 350-363.
- 83.- Lovinger DM. y E Tyler 1996. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Int. Rev. Neurobiol.* 39:77-111.
- 84.- Ludwig A., Flockerzi V., Hofmann F. 1997. Regional expression and cellular localization of α_1 and β subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17:4 1339-49.
- 85.- Marin O, Smeets W, González A 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS*, 21:487-494.

- 86.- Martinoli MG., Dubourg P., GEFARD M., Calas A Kah O. 1990. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the forebrain of the goldfish, *Carassius auratus*. Cell Tissue Res 260: 77-84.
- 87.- Medina L., Smeets WJAJ. 1991. Comparative aspects of the basal ganglia-tectal pathways in reptiles. J Comp Neurol 308: 614-629.
- 88.- Meech RW., Standen NB., 1975. Potassium activation in helix aspersa neurons under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. J Physiol. London 249: 211-239.
- 89.- Melendez-Ferro M., Perez-Costa E., Villar-Cheda B., Abalo XM., Rodriguez-Muñoz R., Rodicio MC., Anadon R. 2002. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neuronal populations in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. J Comp Neurol 446: 360-376.
- 90.- Mintz IM., Adams ME., Bean BP. 1992. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. Neuron 9: 85-95.
- 91.- Missale C, Russel N, Robinson SW, Jaber M and Caron MG 1998 Dopamine receptors from structure to function. Physiol Rev, 78: 189-225
- 92.- Muñoz MD, Gaztelu JM. y Austtb EG. 1998. Homo- and heterosynaptic long-term potentiation in the medial cortex of the turtle brain in vitro. Brain Research. 807: 155 – 159.
- 93.- Monteil A., Chemin J., Leuranguer V., Altier C., Mennessier G., Bourinet E., Lory P., Nargeot J. 2000. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human α_1 subunit. J Biol Chem 275:22.
- 94.- Murakami Y., Kuratami S. 2008. Brain segmentation and trigeminal projections in the lamprey, with reference to vertebrate brain evolution. Brain Res Bull 75: 218-224.
- 95.- Nicola SM., Surmeier DJ., Malenka RC. 2000. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. Annu Rev Neurosci 23, 185-215.

- 96.- Northcutt RG. 1981. Evolution of the telencephalon in non-mammals. *Ann Rev Neurosci*, 4:301-350.
- 97.- Northcutt RG., Reiner A., Karten HJ. 1988. Immunohistochemical study of the telencephalon of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *J Comp Neurol* 277: 250-267
- 98.- Nozaki M., Gorbman A. 1986. Occurrence and distribution of substance P-related immunoreactivity in the brain of adult lampreys *Petromyzon marinus tridentus*. *Gen Comp Endocrinol* 62: 217-229.
- 99.- Nozaki M., Tsukahara T., Kobayashi H. 1984. An immunohistochemical study on the distribution of neuropeptides in the brain of certain species of fish. *Biomed Res* 4: 135-145.
- 100.- Pankaj S. 1996. Ca^{2+} -activated K^+ currents in neurons: types, physiological roles and modulation. *trends neurosci.* 19, 150-154.
- 101.- Papalopulu N., Kintner C. 1993. *Xenopus* Distal-less related homeobox genes are expressed in the developing forebrain and are induced by planar signals. *Development* 117: 961-975.
- 102.- Parent A. 1986. *Comparative Neurobiology of the Basal Ganglia*. New York: John Wiley
- 103.- Pennefather P., Lancaster B., Adams PR., Nicoll RA. 1985. Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc Natl. Acad. Sci.* 82: 3040-3044.
- 104.- Pérez-Garci E. 2003. Caracterización de la modulación del patrón de disparo de la neurona espinosa mediana del neocórtex, por la activación del receptor dopaminérgico tipo D2. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 105.- Pérez-Garci, Vargas J, Galarraga E. 2003 The role of Ca^{2+} channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box 70-253, México, D.F. México.

- 106.- Perez-Reyes E., Schneider T. 1998. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int.* 48:4 111-124.
- 107.- Perez-Reyes E. 2003. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiol Rev* 83: 117–16.
- 108.- Perkel, D. J., Farries, M. A., Luo, M., Ding, L. 2002. Electrophysiological analysis of a songbird basal ganglia circuit essential for vocal plasticity. *Brain Res* 529-32
- 109.- Pierre J., Rio JP., Mahouche M., Repérant J. 1994. Catecholamine systems in the brain of cyclostomes, the lamprey *Lamprota fluviatilis*. In phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. (Smeets WJAJ., Reiner A. Eds) pp 7-19. Cambridge: Cambridge University Press.
- 110.- Pineda, J. C., Galarraga, E., Bargas, J., Cristancho, M., Aceves, J. 1992. Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 287-94
- 111.- Pinuela C., Northcutt RG. 2007. Immunohistochemical organization of the forebrain in the White sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Brain Behav Evol* 69: 229-253.
- 112.- Pombal MA., El Manira A., Grillner S. 1997a. Afferents of lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: A combined tracid and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386: 71-96.
- 113.- Pombal MA., El Manira A., Grillner S. 1997b. Organization of the lamprey striatum -transmitters and projections. *Brain Res* 766: 249-254.
- 114.- Pough FH, Janis CM, Heiser JB.1999. Vertebrate life, 5 Edition: Prentice Hall.

- 115.- Powers AS, Reiner A. 1980. A stereotaxic atlas of the forebrain and midbrain of the eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). *J Hirnforschung* 21:125-159.
- 116.- Randall A., Tsien RW. 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36:7 879-93.
- 117.- Reiner A. 1987. Distribution of proenkephali-derived peptides in the central nervous system of turtles. *JComp Neurol* 259: 65-91.
- 118.- Reiner A. 1994. Laminar distribution of the cells of the origin of the ascending and descending tectofugal pathways in turtles. Implications for the evolution of tectal lamination. *Brain Behav Evol* 43: 254-292.
- 119.- Reiner A., Brauth SE., Kitt CA. Karten HJ. 1980. Basal ganglionic pathways to the tectum: Studies in reptiles. *J Comp Neurol* 193: 565-589.
- 120.- Reiner A., Carraway RE. 1985. The presence and phylogenetic conservation of a neurotensin-related hexapeptide in neurons of globus pallidus. *Brain Res* 341: 365-271.
- 121.- Reiner A., Carraway RE. 1987. Immunohistochemical and biochemical studies on Lys8-Asn9-neurotensin8-13 (LANT6)-related peptides in the basal ganglia of pigeons, turtles and hamsters. *J Comp Neurol* 257: 452-476.
- 122.- Reiner A, Medina L, Veenman CL. 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev*, 28:235-285.
- 123.- Reiner A, Northcutt RG. 1987. An immunohistochemical study of the telencephalon of the African lungfish *Protopterus annectens*. *J Comp Neurol* 256: 463-481.
- 124.- Reiner A, Northcutt RG. 1992. An immunohistochemical study of the telencephalon of Senegal bichir (*Polypterus senegalus*). *J Comp Neurol* 319: 359-386.

- 125.- Richfield EK., Young AB., Penney JB. 1987. Comparative distribution of D1 and D2 receptors in basal ganglia in turtle, pigeons, rats, cats and monkeys. *J Comp Neurol* 262: 446-463
- 126.- Robertson B., Auclair F., Menard A., Grillner S., Dubuc R. 2007. GABA distribution in lamprey in phylogenetically conserved. *J Comp Neurol* 503: 47-63.
- 127.- Rodriguez-Moldes I., Manso MJ., Becerra M., Molist P., Anadon R. 1993. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the brain of elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. *J Comp Neurol* 335: 228-244.
- 128.- Sah P. 1995. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 260, 105-111.
- 129.- Sanchez-Mejorada, E., Sanchez-Mondragon, G., Pineda, J. C., Gonzalez, M., Barral, J. 2009. N-type calcium channels mediate a GABA(B) presynaptic modulation in the corticostriatal synapse in turtle's paleostriatum augmentatum. *Synapse* 855-62.
- 130.- Schiller J y Schiller Y. 2001. NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Curr Opin Neurobiol* 11, 343-348.
- 131.- Schwindt PC., Spain WJ., Foehring RC., Stafstorm CE., Chubb MC., Crill WE. 1988a. Multiple potassium conductances and their function in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J Neurophysiol.* 59: 424-449.
- 132.- Seamans J., Gorelova N. y Yang C. 1997. Contribution of voltage-gated Ca²⁺ channels the proximal versus distal dendrites to synaptic integration in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci* 17, 5936-5948.
- 133.- Siegel S., Castellan NJ. 1995. *Estadística no paramétrica: Aplicada a las ciencias de la conducta.* 4^a edición. México. Trillas
- 134.- Smeets WJAJ. 1981. Efferent tectal pathway in two chondrichthyans, the shark *Scyliorhinus canicula* and ray *Raja clavata*. *J Comp Neurol* 195: 13-23.

- 135.- Smeets WJAJ. 1982. The afferent connections of the tectum mesencephalic in two ondroichthyans, the shark *Scyliorhinus canicula* and ray *Raja clavata*. *J Comp Neurol* 205: 139-152.
- 136.- Smeets y Reiner A. 1994. Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. Cambridge University Press. pp. 103 – 128.
- 137.- Smeets WJAJ., Lopez JM., Gonzalez A. 2001. Immunohistochemical localization of DARPP-32 in the brain of the lizard *Gekko gecko*: Co-occurrence with tyrosine hydroxylase. *J Comp Neurol* 435: 194-210.
- 138.- Smeets WJAJ., Lopez JM., Gonzalez A. 2003. Immunohistochemical localization of DARPP-32 in the brain of turtle *Pseudemys scripta elegans*.
- 139.- Smith SM., Piedras-Rentería ES., Namkung Y., Shin HS., Tsien RW. 1999. Neuronal voltage-activated calcium channels: on the role of α_{1E} and β_3 subunits. *Ann NY AcadSci* 868: 175-98.
- 140.- Song, W. J., Surmeier, D. J. 1996. Voltage-dependent facilitation of calcium channels in rat neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 2290-306.
- 141.- Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP. 1995. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260: 1133–1136.
- 142.- Strauss O., Mergler S., Wiederholt M. 1997 Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASB J* 11:11 869-67
- 143.- Steiner Heinz and Tseng Kuei Y. 2010. Hanbook of Basal Ganglia structure and function. Department of cellular and molecular pharmacology, Rosalind Flanklin University of Medicine and Science, Chicago, USA.

- 144.- Stocker JW., Nadasdi L., Aldrich RW., Tsien RW. 1997. Preferential interaction of ω -Conotoxins with inactivated N-type Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 17:9 3002-1
- 145.- Storm JF. 1987. Action potential repolarization and fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385: 733-759.
- 146.- Storm JF. 1993. Functional diversity of K1 currents in hippocampal pyramidal neurons. *Semin. Neurosci.* 5, 79–92.
- 147.- Striedter GF. 1997. The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol*, 49:179-213.
- 148.- Taban CH., Chatieni M. 1983. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the brain of the newt *Triturus cristatus*. *J Comp Neurol* 216: 453-470.
- 149.- Teramoto T., Niidone T., Kimura M., Ohgoh M., Nishizawa Y., Katayama K., Mayumi T., Sawada K. 1997. A novel type of calcium channel sensitive to ω -Agatoxin- TK in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res* 756:1-2 225-30.
- 150.- Tsien, RW. Hess, E.W. McCleskey and Rosenberg. 1987. Calcium Channels: Mechanisms of selectivity, permeation and block. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16: 265-290.
- 151.- Tsien, RW., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. and Fox, A.P. 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends. Neurosci.* 11: 431-438.
- 152.- Tsien RW., Ellinor PT., Horne WA. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 12:9 349-54.
- 153.- Vacher C. Pellegrini E., Anglade I., Ferriere F., Saligaut C., Kah O. 2003. Distribution of dopamine D2 receptor mRNA in the brain and the pituitary of female rainbow trout: A insitu hybridization study. *J Comp Neurol* 458: 32-45.

- 154.- Vallarido M., Thomas JL., Masini MA., Trabucchi M., Chartrel N., Vaudry H. 1998. Immunohistochemical localization of enkephalin in the brain of African lungfish *Protopterus annectens*, provides evidence for differential distribution of met-enkephalin and leu-enkephalin. *J Comp Neurol* 396: 275-287.
- 155.- Vecino E, Covenas R., Alonso JR., Lara J., Aijon J. 1989. Immunohistochemical study of substance P-like cell bodies and fibers in the brain of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Anat* 165: 191-200.
- 156.- Vecino E, Pinuela C., Arevalo R., Lara J., Alonso JR., Aijon J. 1992. Distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the central nervous system of rainbow trout: an immunocytochemical study. *J Anat* 180: 435-453.
- 157.- Vecino E, Perez MTR., Ekstrom P. 1995. Localization of enkephalinergic neurons in the central nervous system of salmon (*Salmo solar* L) by *in situ* Hybridization and immunohistochemistry. *J Chem Neuro* 9: 81-97.
- 158.- Vergara R., Rick C., Hernández-López S., Laville JA., Guzman JN., Galarraga E., Surmeier DJ. 2003. Membrane potential oscillations of striatal medium spiny neurons in a corticostriatal slice. *J Physiol*.
- 159.- Viana F., Bayliss D., y Berger A. 1993. *J. Neurophysiol.* 69, 2150-2163.
- 160.- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, and Galarraga E. **2000**. Ca^{2+} channels that activate Ca^{2+} -dependent K-currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95: 745–752
- 161.- Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang S, Jarvis E. 2004. The avian brain nomenclature forum: Terminology for a new century in comparative neuroanatomy. *J Comp Neurol.* 2004; 473: E1–E6. doi:10.1002/cne.20119.

- 162.- Wheeler DB., Sather WA, Randall A., Tsien RW. 1994. Distinctive properties of a neuronal calcium channel and its contribution to excitatory synaptic transmission in central nervous system. *Adv second Messenger Phosphoprotein Res* 29: 155-171.
- 163.- Williams M., Marubio L., Deal., C., Hans M., Brust P., Philipson L., Miller R., Johnson E., Harpold M., y Ellis S. 1994. Structure and functional characterization of neuronal α_{1E} calcium channel subtypes. *J. Biol Chem* 269: 22347-22357.
- 164.- Wilson CJ. 1998. The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res.* 99, 277-297.
- 165.- Wilson CJ. 2004. Basal Ganglia. En: Shepherd. G. M. the Synaptic Organization of the Brain. 5^o edición. Ed. Oxford University Press. 361-413pp.
- 166.- Wilson CJ., Groves PM. 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular enject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194: 599-615.
- 167.- Wilson CJ., Groves PM. 1981. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain res* 220, 67-80.
- 168.- Wu LG., Saggau P. 1997. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:5 204-12.
- 169.- Yamaguchi H., Muth JN., Veradi M., Schwartz A., Varadi G. 1999. Critical role of conserved proline residues in the transmembrane segment 4 voltage sensor function and in the gating of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:4 1357-62.