



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**



**Canales de potasio  $K_v1$  que participan en la  
modulación de la liberación de glutamato en la  
sinapsis corticoestriatal de la rata.**

# **T E S I S**

**Que para obtener el título de Biólogo**

Presenta

**David Meneses-San Juan,**

No Cuenta: 307265241

Generación: 2010

Correo electrónico: [datosamel@hotmail.com](mailto:datosamel@hotmail.com)

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

**Director de Tesis**

**Los reyes Iztacala, Edo. México. 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo Proyectos a Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [**Proyecto IN213310, IN212515**] de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Así como del Fondo de Investigación Científica Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [**Proyecto 167147**]. Y del Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA) [**Proyecto PAPCA-2010-2011**] FES Iztacala UNAM al Dr. Jaime Barral.

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias** en la **Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (U.I.I.C.S.E.)** de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo de Julio de 2013 a Diciembre de 2014

Este trabajo se realizó bajo la dirección del

**Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.**

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

2015

## **Agradecimientos.**

A pesar de todo, me considero una persona muy afortunada, he recibido tanto, he aprendido tanto, he sentido tanto, que no sé cómo agradecer a la vida por todo lo que me ha dado, he tenido la fortuna de conocer a muchas personas que a lo largo de mi vida han adquirido una gran importancia para mí, y que hoy, al término de mi tesis reconozco como un gran apoyo y sustento, porque el hecho de terminar la tesis no solo significa concluir parte de mi formación académica, si no también cerrar uno de los ciclos más felices que he vivido y dar comienzo a una nueva etapa llena de incertidumbre, desafíos y oportunidades; estas palabras son para agradecerle a todas esas personas que han caminado junto a mí por la vereda hacia mis sueños; antes que nada quiero dar gracias a mi familia, a mis padres por todo el apoyo a su alcance y por su auténtico e incondicional cariño que me ha alimentado y me ha ayudado a seguir adelante, a mis hermanas Eva y Esmeralda por confiar en mí y darme ánimos cuando el cansancio abrumaba mis días, también quiero dar gracias, en primera instancia a todos mis compañeros de la carrera y en especial a mis amigos que considero más cercanos, a Vero, Ferchis, Oliver, Memo, Luis, Iván, Monse, Ángeles e Iris, también quiero dar gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio, a Angie, Gustavo, Caro, Héctor y Raúl, gracias por las tardes de registro electrofisiológico y todas aquellas pláticas de neurociencia, música y el tan polémico amor, recuerdo con gusto mi estancia en ese laboratorio con ustedes, también quiero agradecer a todos mis amigos de Natanael, que han compartido conmigo ideales, esfuerzos y objetivos en común y que a su lado he vivido el mejor viaje de mi vida, le agradezco también a Eli por apoyarme a lo largo de este camino, por compartirme su tiempo, su vida y enseñarme a través de su fortaleza y su sencillez que siempre hay un motivo para seguir, de igual manera quiero agradecerle a las personas que participaron en mi formación dentro de la carrera, en primer término quiero darle las gracias infinitamente al Dr. Jaime Barral que me permitió ser parte de su gran equipo de trabajo y que me apoyo tanto moral como académicamente, agradezco todos los consejos, las pláticas el interés hacia mi persona y su disposición para compartirme de sus conocimientos y de sus enseñanzas de vida, es una gran

persona y le agradezco que me diera la oportunidad de emprender ese proyecto que hoy se ha convertido en una tesis, también quiero agradecer a la Dra. Clara y al Dr. Manuel por su interés por transmitirme sus conocimientos y por preocuparse por mis avances académicos y personales, por último, pero no por ello menos importantes, quiero darle las gracias a la maestra Llarai y Teresa por inspirarme a ser un profesionalista ético e íntegro y por enseñarme con acciones, una de las lecciones más valiosas que aprendí en la carrera: que la disciplina y el amor hacia la profesión son las mejores herramientas para enfrentarse a la vida. En ese breve recuento faltan muchos nombres, muchas vivencias, pero nunca me alcanzara la tinta, ni el papel ni el corazón para escribir todo lo agradecido que estoy, para describir todo lo que he sentido y vivido, lo único que puedo hacer es tratar de condensarlo todo y guardarlo en bonitos recuerdos y valiosas enseñanzas, pero bien valen las palabras cuando son dichas desde el alma y con sentimiento, es por ello que no me resta más que escribir por última vez y de la manera más sencilla y humilde que puedo: muchas gracias.

***“El futuro pertenece a los hombres que creen en la belleza de sus sueños”.***

## INDICE.

RESUMEN.....	1	HIPÓTESIS: .....	23
INTRODUCCIÓN.....	2	MATERIAL Y MÉTODOS. ....	24
LA TRANSMISION SINAPTICA. ....	2	Organismos. ....	24
Sinapsis eléctrica.....	2	Sistema de estimulación y registro.....	24
Sinapsis química.....	2	Procesamiento de datos. ....	25
Modulación sináptica:.....	5	Potenciales de campo.....	25
CANALES IONICOS.....	6	Protocolo experimental.....	26
LOS GANGLIOS BASALES.....	16	Farmacología.....	29
Anatomía y función. ....	16	Análisis de datos. ....	30
El núcleo estriado (NE). ....	17	RESULTADOS.....	31
Tipos celulares.....	18	αDendrotoxina.....	31
Circuitos sinápticos.....	20	Hongotoxina.....	31
JUSTIFICACION.....	21	Margatoxina.....	33
OBJETIVOS. ....	23	Tytiustoxina.....	33
-General:.....	23	DISCUSIÓN. ....	37
-Particulares: .....	23	LITERATURA CITADA.....	49

## RESUMEN.

Los canales de potasio se dividen funcionalmente en varias familias. Dentro de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_V$ ), la subfamilia  $K_V1$  es una de las más importantes puesto que se encarga del control de la excitabilidad de la membrana en las neuronas, además de que está involucrada en un gran número de funciones celulares tales como la liberación de neurotransmisores y la transmisión sináptica. Distintos miembros pertenecientes a la subfamilia  $K_V1$  tienen especial interés en el área biomédica debido a las patologías con las que se les asocia, tales como: la epilepsia, la ataxia episódica, las mioclonias, la enfermedad de Alzheimer, etc. Debido a ello y a la falta de conocimiento que se tiene sobre la distribución de este tipo de canales en las terminales nerviosas de la sinapsis corticoestriatal y a su participación en la modulación presináptica de la liberación de neurotransmisores, el objetivo principal de este trabajo consistió en identificar los diferentes miembros de la subfamilia  $K_V1$  que están presentes en las terminales de la sinapsis corticoestriatal de rata y que participan en la modulación de la liberación de glutamato en dicha sinapsis. Para ello se utilizó la técnica de registro extracelular empleando el protocolo de “facilitación por pulsos pareados” además de realizar experimentos de oclusión farmacológica utilizando diversos bloqueadores específicos e inespecíficos para uno o más miembros de la subfamilia  $K_V1$ . De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró evidencia de que los canales  $K_V1.1$ ,  $K_V1.3$  y  $K_V1.6$  se encuentran en las aferentes corticoestriatales formando canales homoméricos y/o heteroméricos. En las terminales sinápticas estos canales modulan la liberación de glutamato regulando la entrada de calcio presináptico, a partir del control en la excitabilidad de la membrana. Por lo que se sugiere que dichos canales contribuyen a la generación de los mecanismos que regulan la excitabilidad y la transmisión nerviosas en la sinapsis corticoestriatal.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **LA TRANSMISION SINAPTICA.**

La principal forma de comunicación celular en el sistema nervioso es la transmisión sináptica, en la cual el flujo de información entre dos neuronas se da a través de sitios de unión anatómicamente diferenciados y especializados para este proceso, denominados sinapsis. La neurona que transmite la señal se le conoce como célula presináptica, la neurona que recibe dicha información forma el elemento postsináptico, esta interacción entre la terminal presináptica con el blanco postsináptico produce una respuesta que hace posible la transferencia de información de neurona a neurona desde grandes distancias y con una gran precisión [Meir *et al.*, 1999]. Se pueden distinguir en general dos tipos de sinapsis: La sinapsis eléctrica y la sinapsis química.

#### **Sinapsis eléctrica.**

En este tipo de sinapsis la hendidura sináptica es muy estrecha con aposición en las membranas, lo cual forma “uniones comunicantes con vías de alta conductancia”, por lo que existe una continuidad eléctrica entre la membrana presináptica y la postsináptica, esto permite que los cambios de potencial de una de las neuronas provoque la inmediata despolarización o hiperpolarización de la otra, por lo que no hay retardo sináptico, este tipo de sinapsis son por lo general bidireccionales [Cardinali, 1992]. Las sinapsis eléctricas juegan un papel muy importante en la comunicación entre las células gliales y las neuronas durante el desarrollo y se encuentran diseminadas por todo el sistema nervioso central (SNC) aunque, en general son menos frecuentes que las sinapsis químicas.

#### **Sinapsis química.**

En este tipo de sinapsis la información es transmitida por medio de la liberación de un neurotransmisor desde el elemento presináptico y su difusión a través de la hendidura sináptica para interactuar con membrana postsináptica. La sinapsis química es unidireccional, presenta un retardo sináptico debido en su



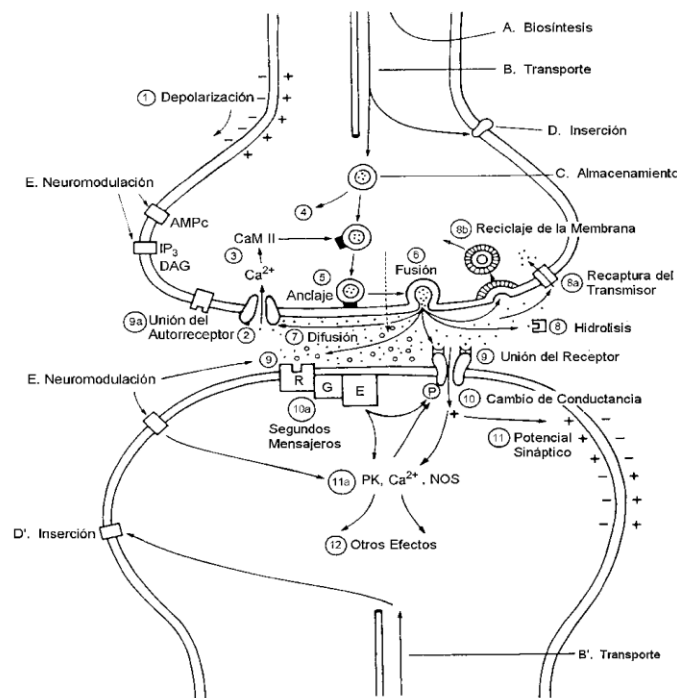
mayor parte al proceso de liberación del transmisor y al tiempo que este tarda en desplazarse en la hendidura sináptica, su duración oscila entre 0.4 y 1.2 ms [Cardinali, 2007].

El evento sináptico se inicia cuando un potencial de acción alcanza la terminal sináptica. El cambio en el potencial de membrana asociado con la llegada del potencial de acción produce la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en la membrana presináptica [Hammond, 2001]. Debido al acentuado gradiente de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana, la apertura de estos canales produce un influjo rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal [Byrne y Roberts, 2004] lo que hace que la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  se incremente desde concentraciones muy bajas (del orden nanomolar) hasta concentraciones cercanas a 200  $\mu\text{M}$ . Este incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  permite que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana plasmática de la neurona presináptica [Siegel *et al.*, 2006; Engelman y MacDermott, 2004].

En general se considera que la liberación de las vesículas sinápticas en la terminal nerviosa ocurre en la zona activa del complejo sináptico [Walmsley *et al.*, 1998] y se desarrolla de la siguiente manera: 1) movilización: después de que se llenan las vesículas sinápticas de neurotransmisor por medio del transporte activo, las vesículas se trasladan hacia la zona activa, 2) anclaje (del inglés "docking"): las vesículas se unen a la membrana citoplásmica en sitios definidos, 3) "cebado": incluye reacciones dependientes de ATP que ocurren después de la exocitosis, 4) fusión: el incremento local de la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  dispara la liberación de vesículas, 5) recuperación y reciclaje: las vesículas vacías se reciclan por medio de la endocitosis [Hammond, 2001].

Inmediatamente después de la liberación de las vesículas sinápticas, los neurotransmisores se difunden y se unen a receptores específicos en la membrana postsináptica. Éstos pueden ser metabotrópicos o ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G, las cuales, al unirse el neurotransmisor con este tipo de receptores, pueden actuar sobre canales iónicos o sobre diferentes tipos de enzimas [Hille, 2001], tales como fosfatasa y cinasas,

para activar las diversas vías de señalización y segundos mensajeros (Ver Figura 1). En el caso de los receptores ionotrópicos, es decir, receptores–canales, la unión del neurotransmisor provoca directamente la apertura de estos canales iónicos dependientes de ligando [Blankenship, 2003] y con ello la alteración del potencial de membrana de la neurona postsináptica, aumentando o disminuyendo así la probabilidad de que se dispare un potencial de acción [Rosenzweig *et al.*, 2005].



**Figura 1. Mecanismo de acción de la sinapsis.** (1) Despolarización de la membrana sináptica; (2) entrada de  $Ca^{2+}$  a la terminal; (3-5) movilización y fusión de la vesícula a su sitio de anclaje; (6) liberación de un paquete (cuanto) de moléculas de neurotransmisor; (7) difusión de los neurotransmisores al espacio sináptico; (9) unión de los neurotransmisores a los receptores en la membrana de la célula postsináptica; (8) o bien, su degradación por diversas enzimas. (10) El neurotransmisor se puede unir a receptores ionotrópicos activando directamente conductancias en la célula postsináptica; (10a) asimismo el neurotransmisor se puede unir a receptores metabotrópicos, lo que involucra la activación de proteínas-G, (11a, 12) activando diversas vías de señalización. (11) la activación de receptores produce cambios en el potencial de la membrana. Abreviaturas: IP3, trifosfato de inositol; CaM II, calcio calmodulin cinasa II; DAG, diacilglicerol. PK, proteínas cinasas; R, receptor; G, proteína-G; E, Enzima efectora; NOS, sintetasa del óxido nítrico [Modificado de Shepherd, 2004].

## **Modulación sináptica:**

Frecuentemente el término de modulación sináptica es empleado para referirse al efecto que tienen diversos factores en la alteración de distintas conductancias iónicas para cambiar la capacidad de respuesta, el disparo y el código de frecuencia de las neuronas y así regular la liberación de neurotransmisores para modificar el mensaje neural [Galarraga y Bargas, 1998].

La modulación puede ocurrir a nivel presináptico o postsináptico. La modulación postsináptica se refleja como una reducción de la respuesta por los receptores específicos afectando directamente la excitabilidad postsináptica, mientras que la modulación presináptica puede producir una disminución en la liberación de neurotransmisores a través del control en la entrada de  $Ca^{2+}$  de la terminal presináptica, y puede servir como un mecanismo para ajustar la eficacia sináptica o prevenir una excesiva liberación de transmisores [Lopez y Brown, 1992].

La modulación sináptica permite que la célula sea controlada por señales internas y externas. En general las sustancias que producen modulación son hormonas y neurotransmisores, los cuales actúan usualmente sobre un receptor que manda señales a la membrana para iniciar una amplia cascada de eventos intracelulares que afectan bombas, enzimas, factores de transcripción y canales iónicos; estos últimos generalmente funcionan como los efectores finales, que son modulados indirectamente a través de segundos mensajeros. La importancia de ello es que este tipo de modulación genera respuestas lentas en cuanto a la activación y desactivación de los canales, lo cual resulta en potenciales sinápticos que facilitan la integración de las señales en las células excitables [Ashcroft, 1999].

La modulación de los canales iónicos puede producir también cambios sostenidos en la actividad de los mismos ya que su apertura o cierre puede durar más que la presencia de la hormona o neurotransmisor, además de que la regulación a través de segundos mensajeros permite la amplificación de las

señales y la divergencia de acciones, debido a que un solo modulador puede actuar sobre diversas proteínas blanco, del mismo modo que un solo tipo de canal puede ser regulado por un número distinto de neurotransmisores que median sus efectos a través de un segundo mensajero común [Ashcroft, 1999].

Los canales iónicos, como últimos efectores en la modulación sináptica, son de gran importancia para la correcta señalización neuronal, por lo que a continuación se abundara un poco más sobre su estructura y función.

## **CANALES IONICOS.**

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman poros a través de los cuales hay un flujo de iones que genera los potenciales eléctricos necesarios para la función neural [Bustamante, 2007]. En las neuronas los canales iónicos están afinados de forma óptima para el procesamiento rápido de la información, estos canales son heterogéneos, de forma que canales diferentes en distintas zonas del sistema nervioso pueden llevar a cabo tareas específicas de transmisión de señales; por ejemplo, se abren y cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas particulares y se encargan de conducir, reconocer y seleccionar iones específicos, sin que esta selectividad llegue a ser absoluta [Kandel *et al.*, 2000]

Existen diversos tipos de canales iónicos que son permeables para distintos aniones y cationes, los más importantes en cuanto a su papel en las excitabilidad neuronal son los de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$ , de los cuales los de  $K^+$  son de particular interés ya que son los responsables del mantenimiento del potencial de reposo de la membrana celular [Dodson y Forsythe, 2004]; además de que participan de manera importante en distintos mecanismos de la transmisión sináptica.

### *Canales de Potasio.*

Los canales de  $K^+$  son el grupo más diverso de canales iónicos, se tienen identificados más de 70 genes diferentes codificados para la subunidad  $\alpha$  de estos

canales en el genoma humano [Coetzee *et al.*, 1999]. La diversidad de los canales de  $K^+$  es creada por la expresión de un gran número de genes, la presencia de empalmes distintos y la formación de canales homoméricos y heteroméricos. De esta manera, dichos canales pueden desempeñar funciones diferentes por virtud de su localización y densidad en compartimientos neuronales específicos.

Los canales de  $K^+$  son reguladores fundamentales en la excitabilidad neural puesto que restablecen el potencial de membrana de reposo a través de la repolarización de la célula [Dodson y Forsythe, 2004]. Estos canales se encargan del control de la frecuencia y la forma del potencial de acción, su funcionamiento está regulado por distintos factores tales como la concentración de  $Ca^{2+}$  y de ATP, la acción de distintas proteínas (quinasas, fosfatasa, y segundos mensajeros) y el cambio de voltaje [Miller, 1995; Alexander *et al.*, 2004].

Los canales de  $K^+$  están estructurados por un poro formado por cuatro subunidades  $\alpha$  que pueden asociarse con subunidades auxiliares (subunidades  $\beta$ ) [Dodson y Forsythe, 2004]. Cada subunidad  $\alpha$  se compone de por lo menos dos hélices transmembranales y un pequeño bucle entre ellas (conocido también como poro P) el cual forma el sello de este tipo de canales [Papazian, 1999]. Dicho arreglo citoarquitectónico de dos hélices internas y un bucle (referido como 2TM/P) constituye la estructura esencial de los canales de  $K^+$  los cuales han sido agrupados dentro de familias y subfamilias basándose en sus propiedades estructurales y funcionales. Existen cuatro grupos: Los canales **2TM** (dos segmentos transmembranales) dentro de los cuales se encuentran los rectificadores entrantes ( $K_{IR}$ ); los canales **4TM**, que son canales insensibles a distintos bloqueadores inespecíficos de  $K^+$  como el Tetraetilamonio (TEA) y la 4-amonipirimida (4-AP), pero que son sensibles a distintas concentraciones de  $Ba^{2+}$ ; los **6TM**, dentro de los que se encuentran los canales dependientes de voltaje ( $K_V$ ), la familia **Slo** activadas por calcio (actualmente con **7TM**) y la familia **SK** activada por  $Ca^{2+}$  [Buckingham *et al.*, 2005]. Y por último los **8TM** que son híbridos de los 6TM/P y 2TM/P, fueron encontrados primero en la levadura [Choe, 2002].

### *Canales de Potasio presinápticos.*

Se ha confirmado la presencia de diversos tipos de canales de  $K^+$  en las terminales sinápticas de los mamíferos, tales como son los dependientes de calcio ( $K_{Ca}$ ), los rectificadores entrantes ( $K_{IR}$ ), los dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), los dependientes de serotonina ( $K_S$ ) y los dependientes de voltaje ( $K_V$ ) [Meir *et al.*, 1999]. Dentro de los cuales los canales  $K_V$  son muy importantes puesto que participan de manera decisiva en la generación de las conductancias presinápticas y en la liberación de neurotransmisores [Dodson y Forsythe, 2004].

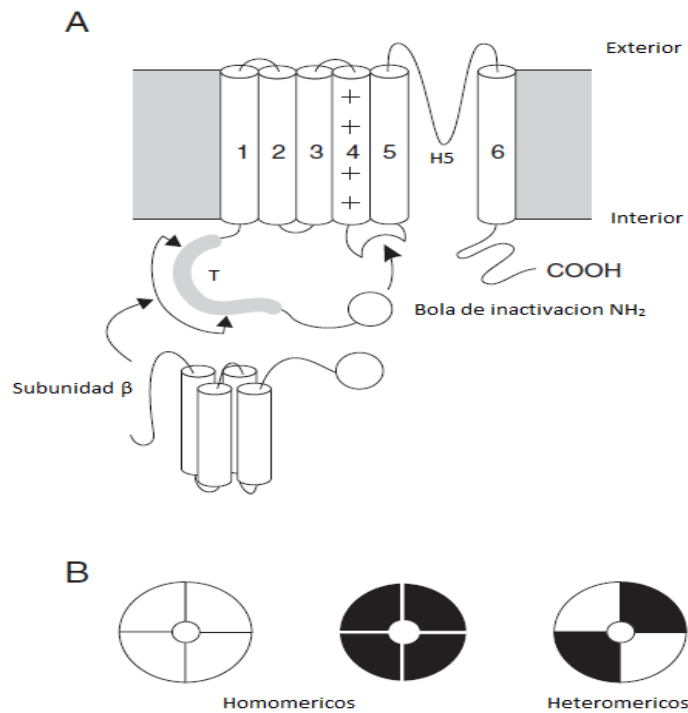
### *Canales de Potasio dependientes de Voltaje ( $K_V$ ).*

Los canales  $K_V$  son la familia más grande dentro de los canales de  $K^+$ , con base a la secuenciación de sus genes se han reconocido doce subfamilias:  $K_V1$ - $K_V12$  [Gutman *et al.*, 2005] las cuales poseen usualmente de 2 a 8 miembros distintos de canales en cada subfamilia [Gutman *et al.*, 2003]. Los  $K_V$  son tetrámeros formados por subunidades primarias las cuales exhiben seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) y un dominio transmembranal (llamado P o H5) entre los segmentos S5 y S6, el cual participa en la formación del poro y en el filtro de selectividad. El segmento S4 está cargado positivamente y junto con las subunidades S1-S3 funcionan como sensor de voltaje (Ver Figura 2). La subunidad  $\beta$  juega un papel importante en la actividad de los  $K_V$  ya que puede modificar significativamente las propiedades de los mismos y la eficiente expresión de canales funcionales en la membrana.

Con base en su funcionamiento, los canales  $K_V$  se pueden dividir en dos grandes grupos:

a) Canales  $K_V$  de inactivación lenta:

A este grupo pertenecen los  $K_V7$  (a menudo llamados KCNQ) y las familias del  $K_V10$  -  $K_V12$  (también conocidos como la familia EAG) contribuyen a la repolarización del potencial de acción y la atenuación de la excitabilidad neuronal.



**Figura 2. Esquema de la estructura de los canales de  $K_v$ .** En A se muestran los seis segmentos transmembranales que conforman la subunidad  $\alpha$ , la región del poro (H5) y la región tipo T donde se une la subunidad  $\beta$ . En B se muestran los distintos tipos de conformaciones de complejos proteicos que pueden presentar este tipo de canales. Tomado de Ashcroft, 1999.

b) Canales  $K_v$  de activación rápida:

Dentro de este tipo de canales se encuentran las subfamilias  $K_v1 - K_v6$ ,  $K_v8$  y  $K_v9$  (colectivamente llamados la familia  $K_{VF}$ , por la rápida activación) [Rudy *et al.*, 2009] las cuales influyen de manera importante en el umbral y la frecuencia de disparo de las neuronas.

En general, los canales  $K_v$  regulan el intervalo interespiga, la excitabilidad postsináptica, la duración, la forma y el disparo de los potenciales de acción, asimismo contribuyen a la repolarización de la membrana celular. Estos canales están cerrados cuando la membrana se encuentra en el potencial de reposo pero son activados cuando ocurre la despolarización y los cambios de voltaje, de ahí su nombre; su función directa es hiperpolarizar a la célula pero indirectamente

también influyen en la generación de la constante de tiempo de la membrana y de las conductancias sinápticas [Dodson y Forshythe, 2004]. Por tanto, la activación rápida de los canales  $K_v$  mantienen la duración potenciales de acción en valores cercanos a 2 ms, mientras que su activación lenta permite potenciales de acción más prolongados [Roeper y Pongs, 1996].

Distintos tipos de canales  $K_v$  realizan una misma función, mientras que otros están especializados para ciertas tareas, por ejemplo, en contraste con muchos otros canales  $K_v$ , las corrientes generadas por los canales  $K_{v2.1}$  incrementan la concentración externa de  $K^+$ , esta inusual característica aparentemente predispone a los canales  $K_{v2.1}$  a ser de especial importancia durante los disparos de alta frecuencia [Shing *et al.*, 2007].

Los canales  $K_{v3}$  están localizados en las zonas donde la información es codificada por los disparos de alta frecuencia de los potenciales de acción, estos canales de activación rápida aceleran la repolarización y limitan la inactivación de los canales de  $Na^+$ , su desactivación también es extremadamente rápida y de este modo se cierran las corrientes hiperpolarizantes; de igual modo algunos miembros de las familias  $K_{v4}$ ,  $K_{v3}$  y  $K_{v1}$  poseen mecanismos de inactivación rápida, lo cual les permite regular la frecuencia o el ritmo de disparo del potencial de acción al igual que la integración de la actividad eléctrica en las dendritas [Shing *et al.*, 2007].

La subfamilia  $K_{v1}$  es una de las más importantes ya que está involucrada en un mayor número de funciones celulares a comparación de los otros tipos de canales  $K_v$  [Lujuan *et al.*, 2003], tales como la liberación de neurotransmisores y la transmisión sináptica [Utsunomiya *et al.*, 2008; Rhodes *et al.*, 1997; Dodson *et al.*, 2003], además esta subfamilia posee un gran número de miembros y tiene especial interés en el área biomédica debido a las diversas patologías con las que se asocia tal como se describirá más adelante; es por ello que el presente trabajo se enfoca en los canales  $K_{v1}$ , los cuales se estudiarán a detalle a continuación.



## Subfamilia K<sub>V</sub>1

El primer canal de K<sup>+</sup> clonado fue llamado “*Shaker*” (*tembloroso*), que corresponde a los canales K<sub>V</sub>1 los cuales son uno de los grupos más importantes por ser considerados como el prototipo de los canales K<sub>V</sub>, son también la subfamilia más grande y la de más amplia distribución en todo el sistema nervioso, además de que en mamíferos presentan la mayor diversidad de miembros dentro de los canales K<sub>V</sub>, puesto que poseen ocho miembros que se nombran del K<sub>V</sub>1.1 al K<sub>V</sub>1.8 [Rudy *et al.*, 2009; Wulff *et al.*, 2009; Gu y Barry, 2011]. Por otro lado estos canales son muy estudiados debido a que su disfunción está vinculada directamente con algunas enfermedades motoras tales como la ataxia episódica tipo I [Ashcroft, 1999], la epilepsia [Schulte *et al.*, 2006] y la mioclonia, estos canales también están asociados indirectamente en algunos desordenes autoinmunes tales como el síndrome de Morvans, la encefalitis límbica, la neuromiotonía y la miastenia gravis [Rudy *et al.*, 2009] además de vincularse con algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [Dougherty *et al.*, 2003], por el contrario, los K<sub>V</sub>1 también han sido estudiados por ser potenciales objetivos farmacológicos en el tratamiento de otros trastornos, como es el caso del canal K<sub>V</sub>1.4 en la esclerosis múltiple [Judge y Bever, 2006], o el K<sub>V</sub>1.3 en la inmunosupresión [Wulff *et al.*, 2009].

Los miembros K<sub>V</sub>1.1, K<sub>V</sub>1.2, K<sub>V</sub>1.5 y K<sub>V</sub>1.6 pueden encontrarse presentes como homómeros y/o heterómeros en una neurona individual y en general todos pueden regular la excitabilidad subumbral. Cuando se estudian de manera aislada múltiples canales, se observa que estos pueden contribuir de forma indistinguible a la generación de la corriente de membrana. Sin embargo, tras un detallado análisis, es posible diferenciar que distintos tipos de los K<sub>V</sub>1 pueden contribuir a muy diversos aspectos de la excitabilidad de la membrana. Esta especificidad funcional puede estar basada en el tipo de célula, en la localización de la membrana, en las características del estímulo y en las circunstancias fisiológicas o ambientales.

Cada miembro de los  $K_v1$  posee distintas características farmacológicas y fisiológicas, a continuación se describirán algunas de ellas para los canales que conforman esta subfamilia basándose en diversos autores [Coetzee *et al.*, 1999; Gutman *et al.*, 2005; Rudy *et al.*, 2009].

**a)  $K_v1.1$ :**

Cuando se expresan como homómeros los canales  $K_v1.1$  presentan una baja inactivación y una media máxima de activación de voltaje cercana a los -30 mV. Tienen una  $IC_{50}$  para el TEA en un rango de 0.3 a 0.5 mM dependiendo del estudio, son bloqueados con 4-AP en un rango de 0.16 a 1 mM. Existe un gran número de toxinas que bloquean a este tipo de canales, sin embargo, la mayoría de ellas bloquea además del  $K_v1.1$  a otros miembros de esta subfamilia como es el caso de la Dendrotoxina (DTx) que produce el bloqueo a concentraciones nanomolares (o a veces picomolares) a través de residuos específicos en la región del poro del canal de  $K^+$ .

**b)  $K_v1.2$ :**

Estos canales están frecuentemente co-asociados en complejos heteromultiméricos (por ejemplo en la terminal sináptica de las neuronas GABAérgicas de la corteza cerebelosa). Sin embargo debido a la falta de especificidad al TEA en la tirosina terminal de la región P, los  $K_v1.2$  son muy resistentes a altas concentraciones de TEA externo. Pero son bloqueados por 4-AP en el mismo rango de concentraciones que bloquea a los  $K_v1.1$ . Estos canales son bloqueados por la  $\alpha$ DTx y la DTX-I al igual que la Tytiustoxina (TyTx) a una  $IC_{50}$  de 105 pM en ratón y 150 pM en humanos. Gracias al empleo de toxinas aún más específicas, como el Osk2 ( $IC_{50} = 97$  nM), se ha podido identificar que probablemente el  $K_v1.2$  es el tipo más abundante dentro de los  $K_v1$  en el cerebro de mamífero [Vacher *et al.*, 2008].

**c) K<sub>v</sub>1.3:**

Hay un considerable interés en la fisiología y farmacología de esta proteína ya que participa de manera crucial en la proliferación de linfocitos T humanos. En sistemas de expresión los K<sub>v</sub>1.3 tienen una media de activación de 30 mV y muestran una inactivación moderada. Su sensibilidad al TEA oscila entre 10 a 50 mM y el 4-AP los bloquea en los mismos rangos que bloquea a los K<sub>v</sub>1.1 y K<sub>v</sub>1.2. Estos canales son resistentes a las DTx, pero son bloqueados por la Margatoxina (MgTx) en el rango de 1 a 10 nM y por la Hongotoxina (HgTx) a concentraciones picomolares (IC<sub>50</sub>= 89 pM) [Koschak *et al.*, 1998]

**d) K<sub>v</sub>1.4:**

En arreglos homoméricos los canales K<sub>v</sub>1.4 forman una rápida inactivación de corriente conocida como corriente “Tipo A”, su umbral esta alrededor de los 50 mV, con una activación media de aproximadamente -22 mV. Poseen una marcada dependencia en la concentración externa de K<sup>+</sup>. Son inhibidos por medios ácidos (pH 6.5)

Estos canales no son bloqueados por DTx ni alguna otra toxina probada aunque existen algunos estudios que muestran que el agente neuroprotector riluzol los inhibe con una IC<sub>50</sub> de 70 μM posiblemente a través de un mecanismo de oxidación en el dominio de inactivación tipo N de este canal.

En general, no hay herramientas farmacológicas disponibles con selectividad y alta afinidad para los K<sub>v</sub>1.4 lo cual es lamentable dado que son de gran importancia para algunas funciones en ciertas regiones del cerebro; por ejemplo, en el retraso del disparo en las NEMs del cuerpo estriado de mamíferos y reptiles [Hammond, 2001].

**e) K<sub>v</sub>1.5:**

Los K<sub>v</sub>1.5 no han sido encontrados en neuronas y su función más importante ocurre en el corazón humano ya que estos canales presentan

una activación ultra-rápida de la corriente  $I_{KUR}$  rectificadora retardada en el atrium del corazón de mamífero. Estos canales son relativamente sensibles a bajas concentraciones de 4-AP, con una  $IC_{50}$  aproximada de 50  $\mu M$ , y son insensibles al TEA aplicado en la cara extracelular del canal, pero sensibles cuando la aplicación se realiza en la cara citoplásmica.

**f)  $K_v1.6$ :**

Los  $K_v1$  se comportan como rectificadores retardados en arreglos homoméricos, se activan a aproximadamente a -50 mV y tienen una media de activación de 20 mV, son sensibles al TEA externo a concentraciones, milimolares, también son bloqueados por 4-AP con una  $IC_{50}$  de entre 0.3 a 1.5 mM. Los  $K_v1.6$  son bloqueados a bajas concentraciones (orden de nM) por la DTx, la Caribdotoxina (ChTx), la MgTx y la HgTx [Bogin, 2006].

**g)  $K_v1.7$ :**

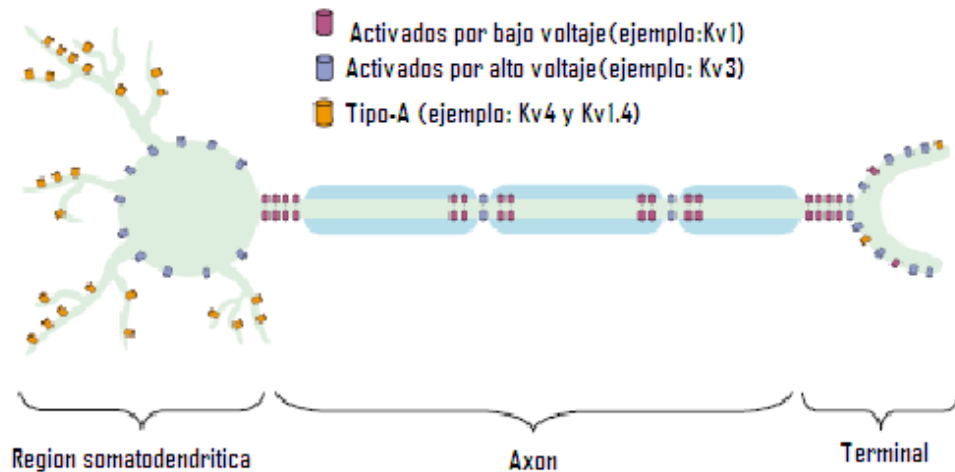
Los  $K_v1.7$  han sido identificados en el corazón a través de técnicas de biología molecular. Son bloqueados por 4-AP con una  $IC_{50}$  aproximada de 250  $\mu M$ , por el tedisamil con una  $IC_{50}$  cercana a los 18  $\mu M$  y por la nifepidina con una  $IC_{50}$  media de 13  $\mu M$ . Son insensibles al TEA externo, pero son potentemente bloqueados por la toxina de la anemona de mar *Sticho dactylon*, la Noxiustoxina [Bowden *et al.*, 2002].

**h)  $K_v1.8$ :**

Los canales  $K_v1.8$  son una nueva isoforma que poseen una inactivación aparentemente dependiente del voltaje con una constante de tiempo de 77.7 a 213.3 ms. Farmacológicamente estos canales son bloqueados por 4-AP y TEA con una  $IC_{50}$  de 68.5  $\mu M$  y 17.1 mM, respectivamente [Fry *et al.*, 2004]. Estos canales se encuentran en el riñón, vasos sanguíneos, la aorta y han sido poco observados en el cerebro [Rudy *et al.*, 2009].

### Distribución de los $K_v1$ .

De forma general los  $K_v1$  se encuentran localizados a lo largo de toda la neurona (Ver Figura 3), de este modo las funciones que realiza cada subtipo de estos canales dependerá de su localización subcelular y su densidad [Dodson y Forshythe, 2004].



**Figura 3. Distribución de los algunos de los canales  $K_v$  en la neurona.** Los canales activados por bajo voltaje (en púrpura; por ejemplo la subfamilia  $K_v1$ ), se encuentran principalmente en el segmento inicial y terminal del axón además de las regiones yuxtaparanodales de los nodos de Ranvier. Los canales activados por alto voltaje (en azul fuerte; por ejemplo la subfamilia  $K_v3$ ) están localizados en la regiones somatodendríticas formando algunas veces gradientes de densidad, también se encuentran en las terminales sinápticas y nodos de Ranvier en algunas fibras mielinizadas del sistema nervioso central (aunque no en los nodos periféricos). Los canales de inactivación tipo-A (en naranja; por ejemplo la subfamilia  $K_v4$  y el canal  $K_v1.4$ ) en términos generales están ampliamente expresados en las dendritas, contribuyendo al disparo neuronal aunque también pueden estar localizados en la terminal sináptica. [Modificado de Dodson y Forshythe, 2004].

De igual manera, los  $K_v1$  exhiben un discreto y selectivo patrón de distribución en todo el cerebro en donde realizan distintas funciones en diferentes circuitos neuronales. Se han encontrado en diversas estructuras tales como el cerebelo [Southan y Robertson, 2000], la corteza [Guan *et al.*, 2006], el hipocampo, el tallo cerebral [Robins y Tempel, 2012] y el estriado, en donde se ha demostrado que los  $K_v1$  participan presinápticamente en la liberación de

dopamina y en el funcionamiento de los receptores D<sub>2</sub> [Martel *et al.*, 2011] al igual que en la liberación de GABA en las terminales que proyectan hacia las neuronas de la sustancia *nigra pars reticulata* [Shimada *et al.*, 2007]. Estos antecedentes nos sugieren la gran importancia que tienen los Kv1 en la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores en los circuitos de los ganglios basales, en especial en los del estriado, el cual es el sustrato anatómico de este estudio debido a la complejidad de sus conexiones y al papel que juega en la actividad motora, es por ello que a continuación se describirá de manera general, la estructura y función de los ganglios basales, y en especial la del estriado.

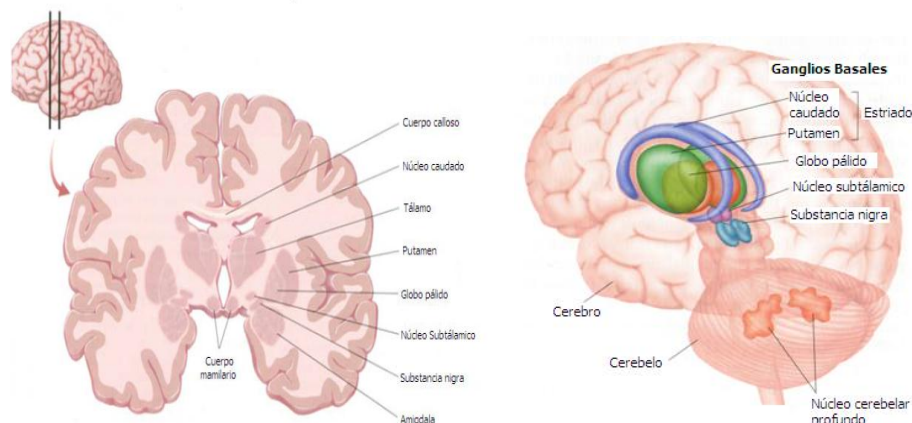
## **LOS GANGLIOS BASALES.**

### **Anatomía y función.**

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales que en su conjunto se encargan de la integración de la información sensitiva para la correcta planeación, iniciación y ejecución del movimiento [Bargas *et al.*, 1998; Graybiel, 1990]. Este sistema de núcleos además participa en distintas funciones no motoras tales como el aprendizaje, [Micheli y Luquin-Piudo, 2012], la formación y el mantenimiento de la memoria de trabajo [Helie *et al.*, 2013]. Los GB están localizados en la parte anteroventral (basal) de los hemisferios cerebrales y se componen por el globo pálido (tanto la porción interna como externa), la sustancia nigra (que se divide en dos regiones, la *pars reticulata* y la *pars compacta*), el núcleo subtalámico (NST) y el neostriado (NE), este último conformado a su vez por los núcleos caudado y putamen (Figura 4).

Todas las aferentes que proyectan los GB a otras estructuras son de carácter inhibitorio (GABAérgicas) y muchas actúan modulando la transmisión a través de otros circuitos [Wilson, 1998].

Los GB tienen una gran importancia ya que, como lo indican numerosas evidencias clínicas, la disfunción de alguno de estos núcleos genera distintos trastornos del movimiento entre los cuales se encuentran los denominados trastornos hipocinéticos, caracterizados por la pobreza y la lentitud de movimientos (por ejemplo: la enfermedad de Parkinson) y los hipercinéticos,



**Figura 4. Esquemas de los GB, en donde se observan sus componentes y localización.** A la izquierda se muestra un corte coronal de los principales núcleos de los GB en un cerebro humano y a la derecha se ve un perfil sagital donde se muestra la localización de los distintos elementos de los ganglios basales en un cerebro humano (Modificado de Gazzaniga et al., 1998).

caracterizados por un exceso de movimiento (por ejemplo: corea, balismo, temblor, tics, distonia, síndrome de las piernas inquietas, mioclonias, estereotipias, acatisia etc) [Micheli, 2006].

### **El núcleo estriado (NE).**

El NE es considerado como el principal núcleo de entrada hacia los GB puesto que presenta numerosas aferencias de la mayoría de las áreas de la corteza, a excepción de las áreas primarias auditivas, las áreas visuales y las áreas olfatorias [Smith y Bolam, 1990].

Tomando en cuenta su totalidad, este núcleo es el más grande de los GB y probablemente el más complejo, ya que muestra varios esquemas organizacionales superpuestos. El NE está compuesto por dos subdivisiones principales: la dorsal y la ventral. En los primates, existe una estructura llamada capsula interna que divide al NE dorsal en el caudado y el putamen. Por el contrario, los roedores carecen de capsula interna, lo que convierte a esta división

en algo más arbitraria, debido a ello se considera que en estos organismos, el NE ventral está formado por el núcleo *accumbens* y las caras más rostrales del caudado y el putamen [Micheli y Luquin-Piudo, 2012]. Por lo tanto, el homólogo en la rata del núcleo caudado y putamen es llamado complejo caudoputamen (CPu) [Devan *et al.*, 2011] o simplemente estriado [Reiner *et al.*, 1998; Wilson, 2004].

El NE es una importante estructura de integración debido a que puede controlar la información utilizando sistemas de dobles inhibiciones que deciden qué acciones se permiten hacer o no, e inhibiendo lo que no se desea o no conviene realizar [Graybiel, 2004]. Para ello el NE contiene diferentes tipos neuronales (con diferentes neurotransmisores y neuromoduladores) interconectados e interdependientes que forman un sistema de conexiones que controla la activación/inhibición de las neuronas eferentes en un perfecto equilibrio.

### **Tipos celulares.**

Existen dos grandes grupos de tipos celulares en el NE: neuronas espinosas medianas (NEMs) e interneuronas. La proporción de las neuronas de proyección con respecto a las interneuronas varía en la escala filogenética desde los roedores hasta los primates [Micheli y Luquin-Piudo, 2012].

#### *Neuronas espinosas medianas.*

Las NEMs son neuronas GABAérgicas de proyección que representan cerca del 95-96% de las neuronas del NE, [Lovinger y Tyler, 1996; Flores *et al.*, 1997; Wilson, 1998]. Estas neuronas reciben su nombre por que poseen un soma de aproximadamente 12-20  $\mu\text{m}$  de diámetro así también como por el gran número de espinas dendríticas que presentan, las dendritas de una neurona individual se extienden sobre un área de aproximadamente 200-400  $\mu\text{m}$  de diámetro [Brodal, 1992].



### *Interneuronas.*

Este tipo de neuronas no se proyectan fuera del NE, pueden ser de tamaño mediano (desde 19 hasta 30  $\mu\text{m}$  de diámetro) o gigantes (hasta 45  $\mu\text{m}$  de diámetro) [Micheli y Luquin-Piudo, 2012]. Estas interneuronas influyen en la actividad de las proyecciones corticoestriatales, ya sea su potenciación a través de interneuronas colinérgicas, o bien su depresión por interneuronas que contienen óxido nítrico. Las interneuronas se clasifican en:

- 1) ***Interneuronas colinérgicas.*** Expresan la enzima colin-acetiltransferasa, representan menos del 2% de todas las células en el NE. Son más abundantes en el putamen que en el caudado y exhiben grandes árboles dendríticos además de que ejercen una poderosa influencia sobre el disparo de las neuronas de proyección [Wilson, 1998; Kawaguchi, 1993].
- 2) ***Interneuronas que contienen GABA y parvalbumina.*** Representan del 3 al 5 % del total de la población neuronal, miden de 16 a 18  $\mu\text{m}$ , poseen escasas dendritas y su axón presenta múltiples colaterales en los campos dendríticos próximos (200 a 300  $\mu\text{m}$ ) [Micheli y Luquin-Piudo, 2012]. Son neuronas de bajo umbral [Kita, 1993] y presentan disparos rápidos sostenidos a altas frecuencias y sin adaptación [Wilson, 1998].
- 3) ***Interneuronas somatostatinérgicas.*** Su tamaño es variable (de 12 a 25  $\mu\text{m}$ ) tienen pocas dendritas y un axón largo (>1000  $\mu\text{m}$ ). Contienen neuromoduladores como el Neuropeptido Y y la somatostatina, se cree que liberan los neurotransmisores según su patrón de actividad eléctrica en cada momento. Presentan un disparo regular, una pronunciada adaptación a la frecuencia de disparo y tienen potenciales con despolarización sostenida [Kawaguchi, 1993].

#### 4) **Interneuronas GABAérgicas que co-localizan con calretinina.**

Representan el 0.3 % de las neuronas estriatales. Son de tamaño medio (7 a 20  $\mu\text{m}$ ), con muy pocas dendritas y sin espinas, no se conoce con certeza su patrón de descarga, pero de manera similar a lo que sucede con las neuronas que expresan parvalbumina pueden llegar a bloquear a las NEMs [Tepper y Bolam, 2004].

### **Circuitos sinápticos.**

Las NEMs reciben aferentes de una amplia variedad de estructuras, principalmente de distintas áreas corticales, tales como son la corteza orbitofrontal, la prefrontal ventromedial, la cingulada anterior, la somatosensorial, la visual extraestriada, la premotora así como las áreas 9, 46 y 8 [Helie *et al.*, 2013] en donde las neuronas piramidales de las capas tres y cinco, [Gerfen y Bolam, 2010] establecen sinapsis principalmente con las espinas dendríticas de las NEMs.

Las fibras de origen, denominadas corticoestriatales, son glutamatérgicas y atraviesan la capsula interna para llegar a su destino [Ojeda e Icardo, 2004]. Esta amplia distribución en cuanto a las aferentes corticales, sugiere que la proyección corticoestriatal opera para recibir varias entradas diferentes y para integrar esta información en las neuronas blanco del NE [Calabresi *et al.*, 1996].

Además de las numerosas aferencias corticales, el NE también recibe proyecciones talámicas glutamatérgicas, al igual que importantes aferencias de células dopaminérgicas del mesencéfalo de la SNc y del área tegmental ventral, así como aferencias serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal las cuales tienden a hacer sinapsis con los tallos y espinas dendríticas en una localización más proximal a las aferentes glutamatérgicas cercanas, lo que posiblemente permite que ejerzan una influencia selectiva sobre los estímulos corticales y talámicos hacia el NE [Wilson, 2004]. Aunque distintas proyecciones pueden entrar al sistema desde fuera de los GB por varios puntos, incluyendo el STN, la SN y el

GP, muchas señales entran al nivel del NE, siendo este la principal estación de aferencias en el circuito de los GB.

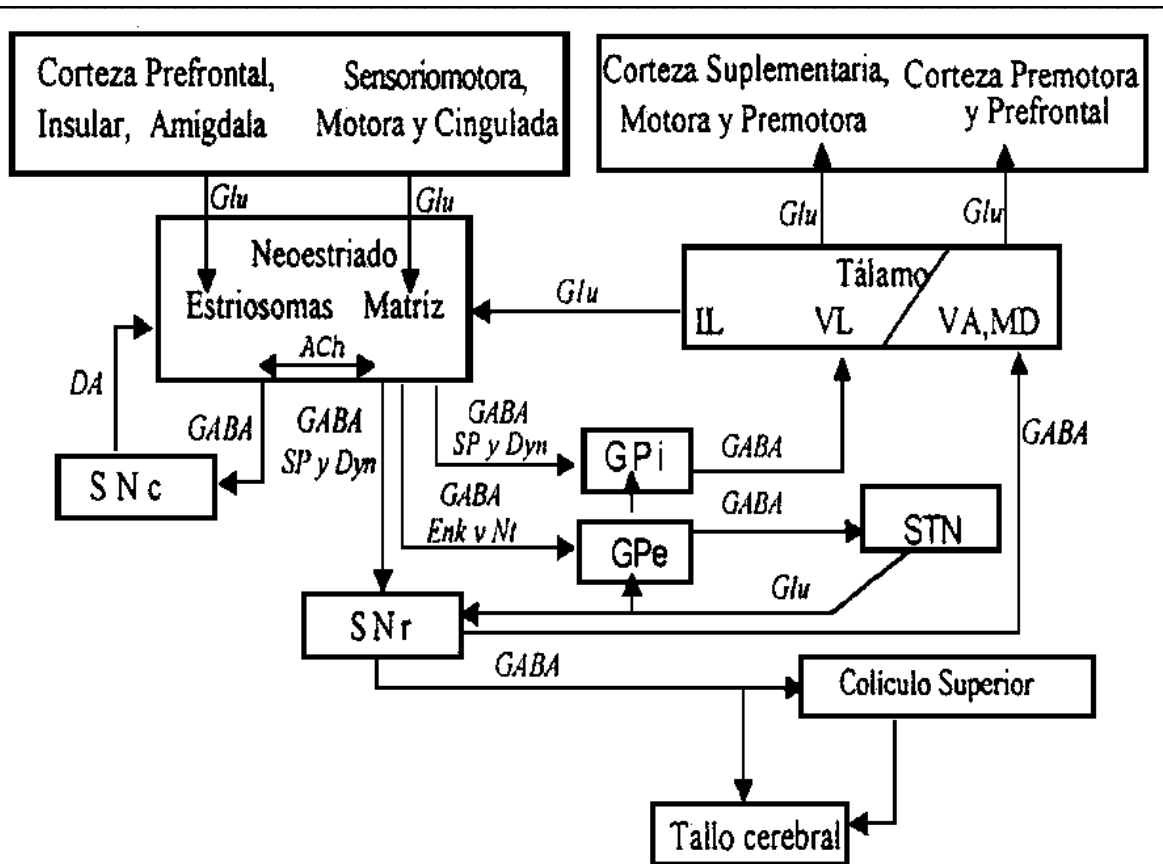
En cuanto a las eferencias del NE, los axones que se originan de las NEMs extienden múltiples colaterales que hacen sinapsis tanto con estructuras locales como extraestriatales, la mayoría de estas neuronas sintetizan GABA, además de uno de los neuropéptidos encefalina (ENK) o sustancia P (SP) [Micheli y Luquin-Piudo, 2012].

Las salidas del NE se proyectan a otras estructuras de los GB (Ver figura 5). Los blancos principales de los axones son tres núcleos: el GPe, el GPi y la SNr [Smith y Bolam, 1990]. Dos de ellas, el GPi y la SNr, proyectan a estructuras fuera de los GB, principalmente al tálamo, al núcleo lateral habenular y a las capas profundas del colículo superior lo cual provee la principal vía de salida para los resultados de las operaciones neuronales desarrolladas dentro del núcleo.

## **JUSTIFICACION.**

Los miembros de la subfamilia  $K_v1$  son de gran interés para el área biomédica y farmacéutica puesto que son considerados como potenciales blancos de acción farmacológica para el tratamiento de diversas enfermedades del sistema nervioso tales como la esclerosis múltiple y la inmunosupresión, además de que miembros específicos de esta subfamilia son responsables directos de patologías como la epilepsia y la ataxia nerviosa. Estos canales participan en la liberación de neurotransmisores y juegan un papel decisivo en el control de la excitabilidad neural y en la regulación de la frecuencia de los potenciales de acción para la correcta transmisión, recepción y codificación de las señales en la sinapsis de distintos circuitos nerviosos, debido a ello el circuito corticoestriatal resulta uno de los más relevantes dentro de los GB por las numerosas conexiones que lo conforman y a su participación en la correcta función motora, es de gran

importancia identificar que miembros de los  $K_v1$  se encuentran en la sinapsis corticoestriatal regulando la liberación de glutamato en un modelo mamífero.



**Figura 5. Principales aferentes y eferentes de los ganglios basales.** En el diagrama se muestra la distribución de la entrada cortical hacia el núcleo estriado, tal como se observa en los mamíferos actuales. Las neuronas de proyección de los estriosomas proyectan hacia la sustancia nigra pars compacta (SNc) y reciben aferentes de ella. Las neuronas espinosas medianas de la matriz proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulata (SNr) así como y al globo pálido interno (GPi) y externo (GPe). 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 recíprocas al núcleo subtálamo (STN), quien a su vez proyecta hacia la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior (VA) y dorsomedial (MD). Estos núcleos proyectan hacia las regiones límbicas de la corteza. En el diagrama se muestran los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías: Acetilcolina (ACh), dopamina (DA), dinorfina (Dyr), encefalinas (Enk), glutamato (Glu), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), neurotensina (Nt) y sustancia P (SP) [Tomado de Barral, 2001].

Es por ello que en este trabajo se plantearon los siguientes:

## **OBJETIVOS.**

### **-General:**

- Identificar los miembros de la subfamilia  $K_V1$  que modulan la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal de rata.

### **-Particulares:**

- Determinar la presencia de canales de  $K^+$  de la subfamilia  $K_V1$  en la terminal presináptica mediante el uso de bloqueadores inespecíficos.
- Analizar la acción de bloqueadores específicos de canales  $K_V1$  en la modulación de la liberación de neurotransmisores en esta sinapsis.
- Determinar específicamente cuál o cuáles canales de  $K^+$  de la subfamilia  $K_V1$ , se encuentran en las terminales sinápticas mediante el empleo de bloqueadores específicos.

## **HIPÓTESIS:**

Sí los diferentes canales de potasio de la subfamilia  $K_V1$  se encuentran presentes en las terminales de la sinapsis corticoestriatal de la rata entonces la aplicación de bloqueadores específicos e inespecíficos de los canales de potasio de la subfamilia  $K_V1$  producirán un decremento en la facilitación por pulso pareado

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Organismos.**

Se obtuvieron rebanadas de cerebro de rata Wistar macho (100-120 g de peso), que fueron alimentadas libremente. Para ello, las ratas fueron previamente anestesiadas con éter etílico, e inmediatamente después decapitadas, el cerebro fue rápidamente removido y sumergido en solución salina isotónica (en mM: 125.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 25.0 NaHCO<sub>3</sub>, 11.0 Glucosa) saturada con una mezcla de 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>, con un pH de 7.4. Manteniéndose a una temperatura de 4 ± 1 °C. Después se separaron bulbos olfatorios, cerebelo y hemisferios cerebrales. Estos últimos fueron colocados en un vibratomo donde se obtuvieron rebanadas de 400 µm de espesor, que se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo no menor a 60 min. En estas condiciones fue posible obtener registros confiables durante aproximadamente de 8 a 10 hrs [Bargas *et al.*, 1998; Barral *et al.*, 2000; 2001; 2003].

Después de la incubación las rebanadas se trasladaron a una cámara de registro en donde se les hizo pasar un flujo constante de 2 ± 0.5 ml/min de solución salina a una temperatura constante de 34 ± 0.5 °C. Todos los fármacos que se utilizaron se disolvieron previamente en solución salina y se administraron a través del dispositivo de perfusión.

### **Sistema de estimulación y registro.**

Se enviaron estímulos eléctricos a través de un electrodo concéntrico bipolar, el cual se colocó entre el cuerpo calloso y el estriado, de esta manera se estimularon las fibras aferentes corticales al NE. Estos estímulos se mandaron digitalmente con auxilio de la computadora, pasándolos a través de una unidad de estimulación (Digitimer, DS2) en donde se reguló la intensidad (0 – 25 Volts), la duración (0.01 - 0.04 ms) y la frecuencia (0.4 - 0.06 Hz).

Los potenciales de campo fueron registrados mediante un microelectrodo de vidrio obtenido a partir de un capilar (estirado por calentamiento, de 1.0 mm de diámetro externo). El electrodo se llenó con una solución de NaCl al 0.9 % utilizada como conductor. El electrodo de registro se colocó dentro del cuerpo estriado siguiendo las estrías a una distancia de aproximadamente 1 a 2 mm del electrodo de estimulación, dependiendo de la actividad observada. Los potenciales de campo se amplificaron, se digitalizaron y se almacenaron para su posterior análisis.

### **Procesamiento de datos.**

La señal electrofisiológica obtenida fue transferida a una computadora PC mediante el uso de programas diseñados en un ambiente LabView (National Instruments, Austin TX, USA) para el Instituto de Fisiología Celular. Cada trazo registrado fue medido, promediado, analizado y graficado mediante el programa Origin (versión 7.5 Microcal Software, Northampton, MA. U.S.A), Sigma Plot (versión 10.0).

### **Potenciales de campo.**

Los potenciales de campo son registros extracelulares de las corrientes iónicas asociadas a la actividad de una población de neuronas. Las corrientes producen espigas poblacionales debido a la sincronía de muchos potenciales de acción. La amplitud de estas espigas depende de la descarga sincrónica de las células, de la distribución de la población neuronal activa y de la resistencia del tejido.

El fluido extracelular constituye un volumen conductor alrededor de las neuronas, en cuya membrana en reposo no se producen flujo de corriente, Sin embargo al ser activadas por un impulso nervioso, la polarización deja de ser uniforme y se producen flujos de corriente de una porción de la neurona a la otra, formando un dipolo a través del fluido extracelular, estableciendo un campo eléctrico [Johnston y Wu, 1995].

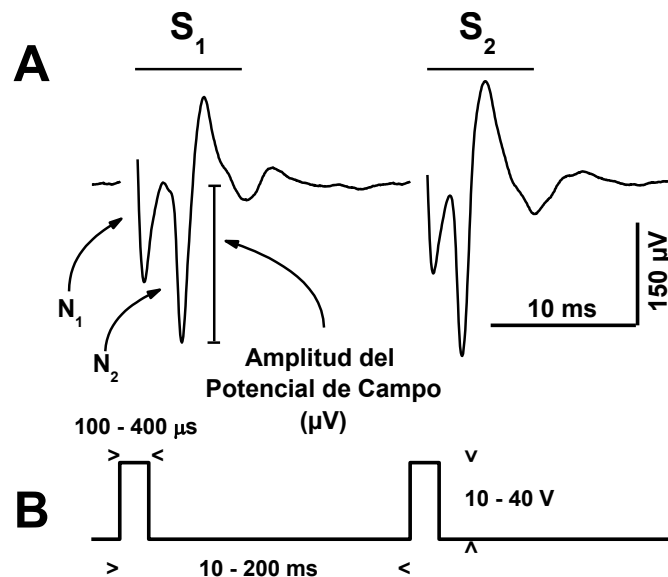
## Protocolo experimental.

Para evidenciar los eventos presinápticos así como también la presencia de los canales de potasio  $K_V1$  en la terminal nerviosa, se utilizó el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP) y el bloqueo de las conductancias de  $K^+$ . El FPP consiste en enviar dos estímulos ( $S_1$  y  $S_2$ ), cercanos en el tiempo (10 – 200 ms) [Barral *et al.*, 2001]. La respuesta al primer estímulo es el componente  $S_1$  (condicionante) y la respuesta al segundo estímulo es el componente  $S_2$  (condicionado) [Dunwiddie y Hass, 1985; Hernández–Echeagaray, 1998; Barral *et al.*, 1999; 2000; 2001]. Así se pueden observar dos tipos de deflexiones negativas en el registro de potenciales de campo en las diferentes preparaciones (Figura 6), la primera deflexión que aparece ( $N_1$ ) en el rango de 2 a 4 ms después del artefacto de estimulación (de origen antidrómico), también llamada descarga presináptica, se debe al estímulo que viaja por los axones de las neuronas. Posteriormente se observa la segunda deflexión negativa ( $N_2$ ), en un rango de 4 a 8 ms, que es de origen ortodrómico o sináptico, la cual se obtiene cuando las aferentes que llegan al árbol dendrítico o al soma de la neurona generan un potencial postsináptico que viaja al cono axónico, donde se origina el potencial de acción.

Cuando las fibras aferentes corticoestriatales son estimuladas a intervalos interestímulo cortos la respuesta de la segunda espiga poblacional ( $S_2$ ) se ve facilitada (aumenta su amplitud) con respecto a la primera ( $S_1$ ).

Para entender el paradigma de la facilitación por pulso pareado, se han planteado varias hipótesis una de ellas es la inactivación de corrientes de  $K^+$  en la terminal presináptica, lo que provocaría incremento en el influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular [Andrew y Dudek, 1985]. Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco estudiada, quizás, la hipótesis más aceptada sea la del  $Ca^{2+}$  residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's [Katz y Miledi, 1968; 1970].





**Figura 6. Registro extracelular de un potencial de campo en estriado de rata.** En A se pueden observar todos los componentes del registro extracelular utilizando el FPP: las primeras dos negatividades posteriores al primer estímulo ( $N_1$ ) que corresponden a la descarga presináptica y posteriormente las dos negatividades ( $N_2$ ) que corresponde a la actividad sináptica propiamente dicha. El primer y el segundo estímulo ( $S_1$  y  $S_2$  respectivamente) están separados por un intervalo de tiempo (intervalo interespiga), para observar la facilitación por pulso pareado a través del cambio en las amplitudes de la espiga. En B se representan las características de los dos estímulos enviados en el FPP, los cuales poseen la misma duración e intensidad y que están separados por una brecha de tiempo de alrededor de los 10 a los 200 ms [Modificado de Barral, 2001].

La hipótesis del  $Ca^{2+}$  residual se basa en la afirmación de que pequeñas modificaciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  celular bastan para alterar sensiblemente la aparición espontánea de potenciales miniatura, y por lo tanto la liberación de neurotransmisor [Del-Castillo y Katz, 1954a; 1954b]. De tal modo que cuando se bloquean conductancias de  $K^+$  la concentración de  $Ca^{2+}$  se incrementa en el interior de la célula, debido a que los canales de  $Ca^{2+}$  que se encuentran en la terminal sináptica permanecen más tiempo abiertos [Barral *et al.*, 2001; 2003]. Así, cuando se mandan trenes de estímulos a intervalos cortos de tiempo se observa ya sea un incremento progresivo (facilitación o potenciación), o bien, un decremento en la amplitud de las respuestas sinápticas (depresión). Esto quiere

decir que grandes cambios en la liberación de neurotransmisor pueden deberse a pequeños cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  [Barral *et al.*, 2000; 2001].

El influjo de calcio a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de Voltaje juegan un papel importante de la liberación de neurotransmisor, Además de la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos, el curso temporal de la repolarización en un potencial de acción presináptico, es controlado por la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  presinápticos, determinando la cantidad del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación y desactivación de muchos de estos canales de  $\text{K}^+$  es voltaje dependiente, por lo que cualquier cambio en el potencial de la membrana, resultado de la invasión de potenciales de acción, podría alterar potencialmente la actividad de estos canales y por consiguiente modular el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a los potenciales de acción subsecuentes. Así los niveles de calcio intracelular pueden también regular a los canales de  $\text{K}^+$  [Quian y Saggau, 1999].

La FPP se evaluó como el cociente entre la amplitud de la respuesta ortodrómica al segundo estímulo ( $S_2$ ) entre la respuesta ortodrómica al primer estímulo ( $S_1$ ):

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

que expresado en porcentaje queda:

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

Durante el control, la intensidad de los estímulos se trató de ajustar para ver la FPP ( $S_2/S_1 \geq 1$ ) en la mayoría de los casos. Esto permite detectar con facilidad los cambios provocados por los bloqueadores de canales de  $\text{K}_v1$ . El intervalo ínterestímulo seleccionado osciló entre 20 y 40 ms, que es donde se observa de manera óptima la FPP [Barral, 2001].

## Farmacología.

Para la identificación de los distintos miembros de los  $K_v1$  se realizaron experimentos de oclusión farmacológica utilizando distintos bloqueadores específicos de los  $K_v1$  comprados a Alomone Labs (Alomone Jerusalem) (Ver Tabla 1). Todos ellos se prepararon en soluciones stock, se disolvieron en la solución salina Krebs y se administraron a la preparación a través del dispositivo de perfusión.

Debido a la falta de especificidad de la mayoría de las toxinas para bloquear solo un tipo de canal  $K_v1$ , una vez tomado el registro control se procedió a utilizar combinaciones secuenciales de diversas toxinas para discriminar específicamente la presencia de cada uno de los miembros de esta subfamilia en la sinapsis corticoestriatal, para ello se realizaron dos series de experimentos con distintas combinaciones, el orden de las toxinas se muestra en la Tabla 2.

**TABLA 1 BLOQUEADORES ESPECÍFICOS DE CANALES  $K_v1$**

Toxina	Origen	Actividad	Concentración
<b><math>\alpha</math>-Dendrotoxina (<math>\alpha</math>DTx)</b>	Serpiente <i>Dendroaspis angusticeps</i>	Bloquea los canales $K_v1.1$ , $K_v1.2$ ( $IC_{50}$ = 0.4 a 4 y de 1.1 a 12 nM, en respectivamente, con altos valores en células de mamífero) y $K_v1.6$ ( $IC_{50}$ =12 nM) <sup>1</sup>	10-500 nM
<b>Hongotoxina (HgTx)</b>	Escorpión <i>Centruroides limbatus</i>	$K_v1.1$ , 1.2 y 1.3 con $IC_{50}$ de 31, 170 y 86 pM respectivamente También bloquea los $K_v1.6$ con baja afinidad ( $IC_{50}$ = 6 nM). <sup>2</sup>	0.1-0.2 pM
<b>Tityustoxina (TyTx)</b>	Escorpión brasileño <i>Tityus serrulatus</i>	Potente bloqueador de los $K_v1.2$ . <sup>3</sup>	0.5-50 nM
<b>Margtoxina (MgTx)</b>	Escorpión <i>Centruroides margaritatus</i>	Bloqueador específico de los $K_v1.3$ ( $IC_{50}$ ~30 pM) y también los $K_v1.6$ <sup>4</sup>	50pM-50 nM

**Tabla 1. Bloqueadores específicos de uno o más miembros de los  $K_v1$  que se emplearon para la identificación de los  $K_v1$  en la sinapsis corticoestriatal.** Harvey. 2001<sup>1</sup>. ; Koschak et al. 1998<sup>2</sup>. ; Werkman et al. 1993<sup>3</sup> y García-Calvo et al. 1993<sup>4</sup>.

**TABLA 2. COMBINACIONES DE TOXINAS PARA IDENTIFICAR CANALES Kv1**

<b>Toxinas</b>	<b>Canales bloqueados</b>	<b>Canales discriminados</b>
<b>HgTx</b>	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3	Kv1.6
<b>+ <math>\alpha</math> DTx</b>	Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6	
<b>MgTx</b>	Kv1.3	Kv1.3
<b>+TyTx</b>	Kv1.2	Kv1.2
<b>+HgTx</b>	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3	Kv1.1
<b>+ <math>\alpha</math> DTx</b>	Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6	Kv1.6

*Tabla 2. Combinaciones de toxinas empleadas para discriminar selectivamente la presencia de los distintos miembros de la subfamilia Kv1. Las toxinas se agregaron de manera secuencial, es decir, primero se agregó una toxina, se registró el efecto e inmediatamente después de observado dicho efecto se agregó la siguiente toxina en presencia de la toxina anterior para ir discriminando los canales bloqueados por cada nueva toxina.*

### **Análisis de datos.**

La significancia estadística de los cambios observados con el protocolo de FPP se determinó tomando muestras de datos antes (Control) y después (Experimental) de la aplicación de los diferentes bloqueadores de los canales de Kv1. Los cambios en la FPP se expresaron en porcentajes (Media  $\pm$  SEM). Se aplicaron pruebas no paramétricas (Prueba de Wilcoxon para datos pareados). Cuando se utilizaron dos o más bloqueadores se hicieron pruebas de varianza de una cola, y posteriormente una prueba pos hoc de Duncan para determinar la significancia estadística. Para la realización de las pruebas estadísticas se utilizó el software comercial SigmaStat (SYSTAT software, Sn Jose California USA) [Brown y Rhotery, 1993; Daniel 2002]

## **RESULTADOS.**

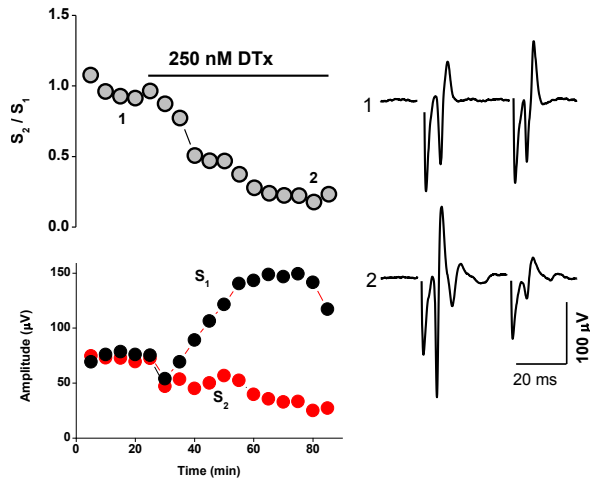
Para determinar si diferentes tipos de canales  $K_V1$  participan en la modulación de la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal de rata primero se realizaron experimentos de oclusión farmacológica utilizando individualmente antagonistas específicos para los  $K_V1$ , obteniendo los siguientes resultados:

### **$\alpha$ Dendrotoxina.**

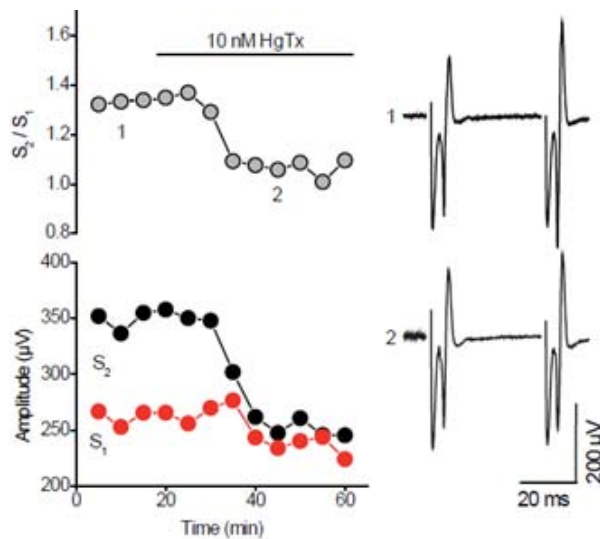
La  $\alpha$ DTx bloquea los canales  $K_V1.1$ ,  $K_V1.2$  y  $K_V1.6$  a concentraciones nanomolares [Harvey, 2001], la aplicación de 100 nM de  $\alpha$ DTx produjo un notable cambio en la FPP de  $1.30 \pm 0.10$  (mediana: 1.20; rango: 0.85 - 2.15) a  $0.83 \pm 0.12$  (mediana: 0.73; rango: 0.21 - 1.74) (79.07%,  $n = 14$ ;  $P < 0.001$ ; prueba de Wilcoxon) como se puede observar en la Figura 7, lo cual nos indica la posible presencia de los canales  $K_V1.1$ , 1.2 y 1.6 en la terminal presináptica y su participación en la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal.

### **Hongotoxina.**

La aplicación de 10 nM de HgTx en la preparación de cerebro de rata provocó la disminución en la amplitud del  $S_2$  con respecto al control (Figura 8), se produjo una moderada disminución en la FPP con un cambio de  $1.62 \pm 0.28$  (mediana: 1.42; rango: 1.14 - 2.69) a  $1.34 \pm 0.23$  (mediana: 1.06; rango: 1.00 - 2.36; 17.038 %;  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ; Wilcoxon test). Lo que sugiere que quizá al menos uno de los canales  $K_V1.1$ ,  $K_V 1.2$  y  $K_V 1.3$  pudiera estar presente en la sinapsis corticoestriatal.



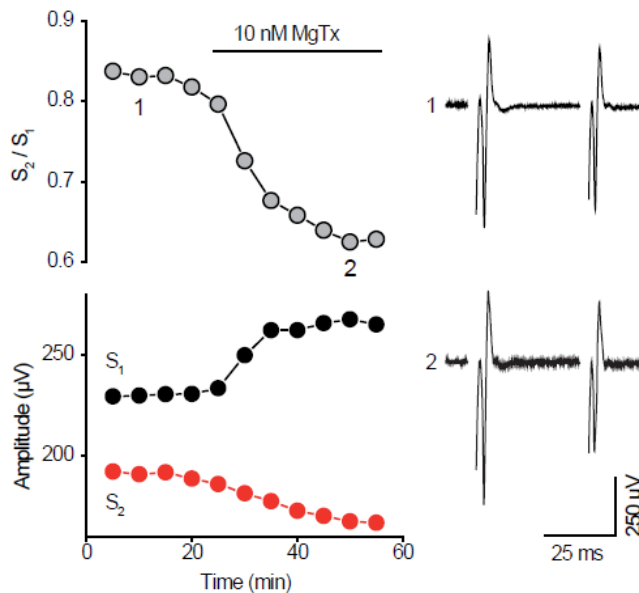
**Figura 7. Efecto del bloqueo de canales de potasio con  $\alpha$ Dendrotoxina en la sinapsis corticoestriatal.** En el panel superior de la izquierda se muestra cambio en la facilitación por pulso pareado ( $S_2/S_1$ ) en la relación entre la respuesta al segundo estímulo ( $S_2$ ) en relación con el primero ( $S_1$ ), antes y después de la aplicación de la  $\alpha$ DTX que bloquea canales  $K_v1.1$ , 1.2 y 1.6. En el panel de abajo a la izquierda se muestran las amplitudes que se obtienen al enviar los estímulos  $S_2$  y  $S_1$ . A la derecha se observan los trazos indicados por los números en el panel de la izquierda. La barra indica el momento de la aplicación del agente bloqueador.



**Figura 8. Efecto del bloqueo de canales de potasio con Hongotoxina en la sinapsis corticoestriatal.** En el panel superior de la izquierda se muestra cambio en la facilitación por pulso pareado antes y después de la aplicación de HgTX que bloquea canales  $K_v1.1$ , 1.2 y 1.3.

## Margatoxina.

En cuanto a la MgTx, su administración a una concentración de 10 nM disminuyó considerablemente la amplitud del  $S_2$  con respecto al control (Figura 9), lo cual produjo un importante cambio en la FPP de  $1.37 \pm 0.20$  (mediana: 1.44; rango: 0.76 – 2.04) a  $1.10 \pm 0.15$  (mediana: 1.13; rango: 0.62 – 1.62; 20.87 %;  $n = 6$ ;  $P = 0.031$ ; Wilcoxon test). La MgTx al ser un bloqueador específico para el  $K_V1.3$  nos confirma la presencia de este canal en la terminal de la sinapsis corticoestriatal y su participación en la liberación de neurotransmisor.

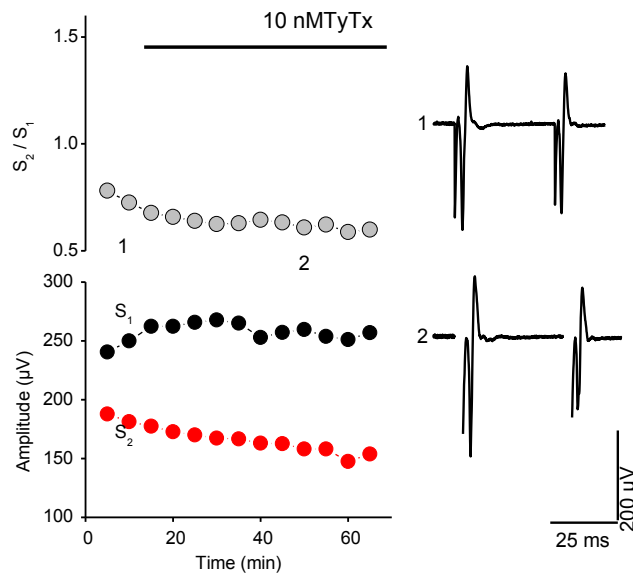


**Figura 9. Efecto del bloqueo de canales de potasio con margatoxina en la sinapsis corticoestriatal.** En el panel superior de la izquierda se muestra cambio en la facilitación por pulso pareado antes y después de la aplicación de MgTx que bloquea canales  $K_V1.3$ .

## Tytiustoxina.

La tytiustoxina  $K\alpha$  (TyTx  $K\alpha$ ) es un potente bloqueador de los canales  $K_V1.2$  que actúa extracelularmente bloqueando el sitio de unión del canal (Werkman *et al.*, 1993). En la Figura 10 se puede observar que la administración de 10 nM de TyTx  $K\alpha$ , en contraste con las otras tres toxinas, no produjo ninguna variación

importante en la FPP con respecto al control, pues cambio de  $1.37 \pm 0.21$  (mediana: 1.44; rango: 0.77 – 2.06) a  $1.055 \pm 0.16$  (mediana: 1.02; rango: 0.59 – 1.72; 18.49 %;  $n = 6$ ; NS; Wilcoxon test), lo cual nos indica que posiblemente el canal  $K_v1.2$  no se encuentra participando en la modulación presináptica de la liberación de neurotransmisor en esta sinapsis.



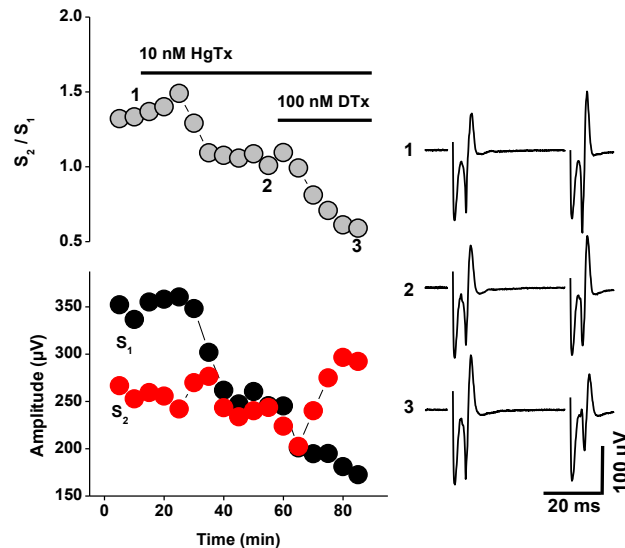
**Figura 10. Efecto del bloqueo de canales de potasio con tytiustoxina en la sinapsis corticoestriatal.** En el panel superior de la izquierda se muestra un cambio nulo en la facilitación por pulso pareado antes y después de la aplicación de TyTx que bloquea canales  $K_v1.2$ .

### Aplicación simultanea de toxinas.

Una vez probadas cada una de las toxinas por separado, se procedió a realizar dos series de experimentos con distintas combinaciones de estas (Ver Tabla 2) para identificar específicamente la presencia de cada tipo de los canales de  $K^+$  de la familia  $K_v1$  en la sinapsis corticoestriatal, se inició con la combinación de 10 nM de HgTx + 100 nM de  $\alpha$ DTx, en la que después de grabar el control, la administración de 10 nM de HgTx produjo una disminución en la FPP (Figura 11), como ya se describió previamente, la HgTx bloquea los canales  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$  y



Kv1.3. En esas condiciones se le adicionó la  $\alpha$ DTx, que bloquea los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6., y a pesar de tener algunos canales bloqueados, la acción de esta última toxina produjo una mayor disminución de la FPP, sugiriendo la presencia del canal Kv1.6.

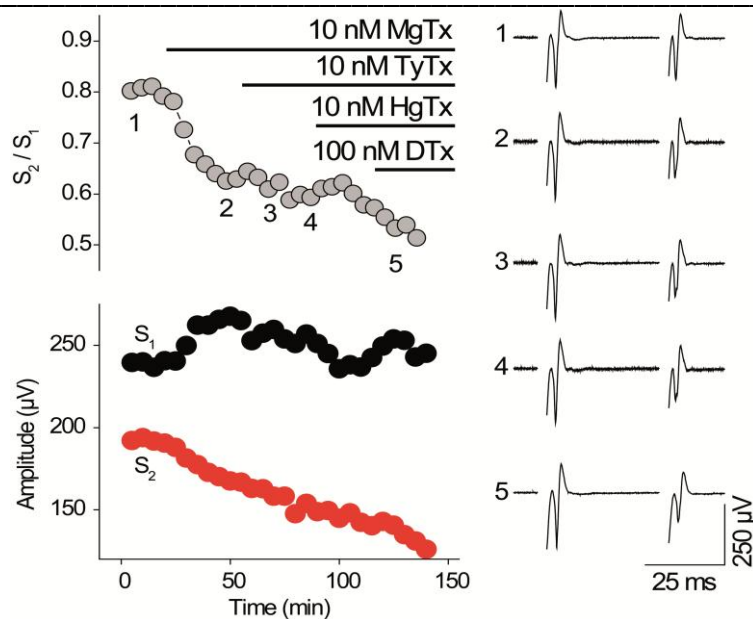


**Figura 11. Efecto del bloqueo de los canales Kv1 con HgTx +  $\alpha$ DTx.** Se observa el curso temporal del efecto que tiene HgTx +  $\alpha$ DTx en el cambio de PPF. Se muestran además las amplitudes en ese experimento y los trazos representativos del mismo: (1) control, (2) la respuesta en presencia de HgTx, y (3) la respuesta en presencia de HgTx +  $\alpha$ DTx.

Las diferencias en los valores medios entre los dos tipos de toxinas utilizadas son mayores de lo que cabría esperar por azar; por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa ( $F = 22406$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ ) al aplicar un análisis de varianza (Anova de una cola), el análisis post hoc por el método Duncan resulto significativo para ambas toxinas ( $P < 0.05$ ).

Para determinar la presencia y participación en la liberación de neurotransmisores de cada uno de los otros dos posibles canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_v1.1$  y  $K_v1.3$ ) hallados en la sinapsis corticoestriatal con la primera serie de experimentos, se realizó otra serie de experimentos en donde se probó una segunda combinación de bloqueadores: 10 nM MgTx + 10 nM TyTx+

10 nM HgTx + 100 nM  $\alpha$ DTx. Como se aprecia en la Figura 12 la aplicación de MgTx produjo una sensible disminución en la FPP, posteriormente la aplicación de TyTx no produjo cambios significativos. La consecutiva administración de HgTx si provoco una pequeña disminución en la FPP que resulto estadísticamente significativa. Por último la aplicación de  $\alpha$ DTx, también disminuyo la FPP de manera importante. Por lo que las diferencias en los valores medios entre las cuatro toxinas utilizadas son mayores de lo que cabría esperar por azar; mostrando diferencias estadísticamente significativa ( $F = 3.533$ ,  $P = 0,025$ ,  $n = 5$ ) al aplicar un análisis de varianza (Anova de una cola), el análisis post hoc por el método Duncan resulto significativo para MgTx, HgTx, y DTx ( $P < 0.05$ ), lo que sugiere que en la terminal sináptica corticoestriatal se encuentran presentes los canales  $K_V$  1.1,  $K_V$  1.3 y  $K_V$  1.6, pero no el  $K_V$ 1.2.



**Figura 12. Efecto del bloqueo de los canales  $Kv1$  con  $MgTx + TyTx + HgTx + \alpha DTx$ .** En A se observa el curso temporal del efecto que tiene  $MgTx + TyTx + HgTx + \alpha DTx$  en el cambio de PPF. La barra indica la aplicación del agente bloqueador. En B se muestran trazos representativos del experimento, el número uno marca el trazo control, el dos la respuesta en presencia de  $MgTx$ , el tres en presencia de  $MgTx + TyTx$ , el cuatro de  $MgTx + TyTx + HgTx$  y el cinco la respuesta en presencia de  $MgTx + TyTx + HgTx + \alpha DTx$ .

## **DISCUSIÓN.**

En el presente estudio se identificaron a los distintos miembros de los canales  $K_v1$  que se encuentran en la terminal de la sinapsis corticoestriatal del cerebro de rata, y se determinó de manera indirecta, si tales canales participan en la liberación de glutamato en dicha sinapsis, para ello se realizaron experimentos de bloqueo farmacológico en los cuales se aplicaron, de forma individual y en conjunto, distintos bloqueadores específicos para uno o más miembros de la familia  $K_v1$ ; se obtuvieron registros electrofisiológicos a través de la técnica de registro extracelular y se empleó el protocolo experimental de FPP para evaluar los eventos presinápticos. Los resultados encontrados de dichos experimentos nos indican que los canales  $K_v 1.1$ ,  $K_v 1.3$  y  $K_v 1.6$  se encuentran presentes en la sinapsis corticoestriatal modulando presinápticamente la liberación de neurotransmisor.

### **Validez del Protocolo de FPP como paradigma de estudio para la identificación de canales presinápticos.**

Como primer punto es necesario explicar por qué el protocolo de FPP es el paradigma experimental más adecuado para identificar la presencia de los canales  $K_v1$  en la terminal corticoestriatal; este protocolo ha sido utilizado por un sinnúmero de investigadores para evaluar los eventos presinápticos [Dunwiddie y Hass, 1985; Mennerick y Zorumski, 1995; Isaacson y Walmsley, 1995; Hernández–Echeagaray, 1998; Barral *et al.*, 1999; 2000; 2001; 2003] debido a la facilidad con la que se pueden manipular distintos parámetros, como la intensidad y la duración del estímulo, lo cual, junto con el empleo de fármacos puede evidenciar de manera más directa la existencia de fenómenos presinápticos.

La FPP es tradicionalmente explicada por la hipótesis del calcio residual de Katz y Miledi (1998) de acuerdo a la cual, una pequeña fracción de  $Ca^{2+}$  que entra a la terminal en respuesta al primer potencial de acción sigue ingresando varios cientos de milisegundos después del estímulo inicial. Esta cantidad de  $Ca^{2+}$

residual es muy pequeña para desencadenar por si sola una gran liberación de neurotransmisores, sin embargo, durante el segundo estímulo entra una mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  el cual se suma al anteriormente acumulado en la terminal provocando así una mayor liberación de neurotransmisores [Debane *et al.*, 1996], este evento se ve reflejado en el registro como un aumento en la amplitud de la segunda respuesta sináptica a comparación de la primera, a lo cual se le conoce como facilitación por pulso pareado (FPP), de igual manera existe la condición contraria en donde disminuye la amplitud de la segunda respuesta debido al decremento transitorio en el contenido cuántico, fenómeno que se le conoce como depresión por pulso pareado (DPP) y que es explicada por distintos mecanismos presinápticos tales como la falta de vesículas sinápticas disponibles para ser liberadas o la ausencia de zonas activas en las cuales estas vesículas puedan fusionarse y liberar su contenido en la hendidura sináptica [Wilcox y Dichter, 1994]. En nuestros experimentos la aplicación de distintos bloqueadores de los  $\text{K}_v$  produjo cambios en la FPP lo cual refleja un incremento en la probabilidad de la liberación de neurotransmisores [Barral, 2001] y dado que la liberación de neurotransmisores es un evento presináptico, podemos deducir que los canales que fueron bloqueados y que por ello produjeron una disminución en la FPP o un aumento en la DPP, se encuentran en la terminal participando en la liberación de neurotransmisores, en particular sobre la liberación de glutamato, debido a que este es el neurotransmisor principal en la sinapsis corticoestriatal [Wilson, 1998].

### **Bloqueo con $\alpha$ Dendrotoxina.**

La  $\alpha$ Dendrotoxina es una pequeña proteína de alrededor de 59 aminoácidos que se extrae del veneno de la serpiente “mamba verde” (*Dendroaspis angusticeps*). Esta neurotóxina es comúnmente usada en estudios inmunohistoquímicos y electrofisiológicos para caracterizar distintos miembros de canales de la subfamilia  $\text{Kv}1$  en diferentes estructuras cerebrales ya que a concentraciones nanomolares (10 – 500 nM) es un potente bloqueador de los subtipos  $\text{Kv}1.1$ ,  $\text{Kv}1.2$  y  $\text{Kv}1.6$  [Harvey, 2001], los cuales forman la llamada

corriente  $D(I_D)$  de canales sensibles a la DTx, estos canales han sido identificados en muchos tipos de neuronas, tales como las neocorticales, hipocampales y piramidales y muestran una considerable variabilidad de sus propiedades dependiendo del tipo de célula en la que se encuentren debido quizá a la diversa composición de sus subunidades [Gutman *et al.*, 2005].

El efecto que produjo la aplicación de la  $\alpha$ DTx en la preparación corticoestriatal que se reporta en este trabajo coincide con los resultados obtenidos por Richards y Morrone (1999), los cuales indican que de igual manera la aplicación de  $\alpha$ DTx produce el aumento en la liberación de glutamato en células hipocampales de la región CA1, provocado, probablemente, por el bloqueo de los canales Kv1.

De acuerdo a los experimentos realizados en este estudio la aplicación de 100 nM de  $\alpha$ DTx produjo una clara disminución en la FPP en un 79.07 % (prueba de Wilcoxon), tal como se puede observar en la Figura 7; esta disminución en la facilitación refleja un aumento en la probabilidad de la liberación de neurotransmisores producido por el bloqueo de las corrientes de los  $K_V1$ , indicando que posiblemente al menos alguno de los canales Kv1.1, Kv1.2 y/o Kv1.6 se encuentra presente en la terminal presináptica de la sinapsis corticoestriatal de rata.

### **Bloqueo con Hongotoxina.**

La HgTx es un péptido compuesto de 39 aminoácidos que se obtiene del veneno del escorpión de América Central, *Centuroides limbatus*, posee una secuencia homóloga en un 89 % con la MgTx y a concentraciones nanomolares es un potente bloqueador de los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3, además de que también se tiene reportado que inhibe con mucho menor afinidad al Kv1.6 ( $K_d = 9.6 \text{ pM}$ ) [Koschak *et al.*, 1998]. En este trabajo se encontró que la aplicación de 10 nM de HgTx produjo una disminución en la FPP en un 17.038 %, de acuerdo a la prueba de Wilcoxon, este hecho refleja que es probable que uno o algunos de los canales Kv1.1, Kv1.2, y/o Kv1.3 se encuentren en la terminal de la sinapsis

corticoestriatal, a diferencia del Kv1.6 el cual debido a su débil afinidad con la HgTx no fue bloqueado.

### **Bloqueo con Tytiustoxina.**

La TyTx es un pequeño péptido que se compone de 60 a 70 aminoácidos que se encuentran ligados a través de 3 a 4 puentes disulfuro y es extraída del veneno del escorpión brasileño *Tityus serrulatum* [Barhanin *et al.*, 1982]. La TsTx a bajas concentraciones (0.5 – 50 nM) es un potente y selectivo inhibidor del Kv1.2 que actúa bloqueando extracelularmente el canal [Werkman *et al.*, 1993]. En este estudio se empleó 10 nM de TsTx para producir el bloqueo e identificación del Kv1.2 en la terminal corticoestriatal, sin embargo, la TsTx solo provocó un ligero cambio (18.49 %) en la DPP el cual resultó no ser significativo (prueba de Wilcoxon) indicándonos que es muy probable que el Kv1.2 no se encuentre en la presinapsis corticoestriatal o que su participación en la liberación de glutamato es indirecta o nula, lo cual por una parte difiere al hecho de que el subtipo Kv1.2 es uno de los canales, dentro de los Kv1, más abundante en el cerebro de mamífero [Vacher *et al.*, 2008], además de que se tiene reportada la expresión de RNAm de la subunidad  $\beta$ Kv1.2 en NEMs [Shen *et al.*, 2004], no obstante a ello, es importante señalar que los diferentes miembros de los Kv1 pueden co-ensamblarse con distintas subunidades para formar canales heterotetrámeros que poseen propiedades intermedias de los subtipos de canales que lo formaron y este ensamble con las subunidades auxiliares puede impactar dramáticamente la expresión, localización y función de los heterotetrámeros resultantes [Vacher *et al.*, 2008], por lo cual se sugiere que el canal Kv1.2 puede encontrarse co-ensamblado con otras subunidades que no le permitan su expresión en la terminal de la sinapsis corticoestriatal o su participación en la liberación de glutamato lo cual explicaría el por qué no pudimos identificar su presencia en el registro extracelular con los experimentos de oclusión farmacológica.

### **Bloqueo con Margatoxina.**

La MgTx es un péptido extraído del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* [Garcia-Calvo *et al.*, 1993], está conformado por 39 aminoácidos y tres puentes disulfuro, una cadena media ( $\alpha$ -hélice) y un carbono terminal, comparte secuencias homologas con la Caribdotóxina (ChTx) [Rappuola y Montecucco, 1997] y al igual que esta última es un potente inhibidor del canal Kv1.3 a concentraciones nanomolares [Garcia-Calvo *et al.*, 1993]; aunque existen estudios que indican que también bloquea el Kv1.6 con muy poca afinidad. Se tiene reportado que la aplicación de 1 a 100 nM de MgTx produce la liberación de neurotransmisores en el estriado de rata a través de la inhibición de los canales Kv que son sensibles a MgTx [Saria *et al.*, 1998], tal hecho concuerda con nuestros datos ya que la administración de 10 nM de MgTx produjo un aumento en la DPP en un 20.87% lo cual indica que se está liberando más neurotransmisor al bloquear el Kv1.3, por lo que consideramos que el Kv1.3 se encuentra en la terminal de la sinapsis corticoestriatal participando en la liberación de glutamato.

### **Bloqueo de toxinas combinadas.**

#### ***Hongotoxina y $\alpha$ Dendrotoxina.***

De acuerdo al análisis de varianza, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ,  $n = 5$ ) en los cambios de la FPP producidos por la aplicación de 10 nM de HgTx y de 100 nM de  $\alpha$ DTx, el bloqueo con HgTx produjo una disminución en la FPP lo cual sugiere la posible presencia de uno o algunos de los canales Kv1.1 Kv1.2 y/o Kv1.3 en la terminal corticoestriatal, posteriormente la aplicación de  $\alpha$ DTx en presencia de la HgTx produjo una mayor disminución en la FPP aun con los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3 bloqueados por la HgTx, este hecho nos confirma la presencia del canal Kv1.6 en la terminal de las neuronas piramidales de la sinapsis corticoestriatal. En general se tiene reportado que este canal se encuentra principalmente en interneuronas, en las dendritas de distintos tipos de neuronas [Rhodes *et al.*, 1997] y en las regiones yuxtaparanodales en axones mielinizados [Kew y Davies, 2010] aunque también existen algunos datos que al igual que los nuestros confirman la presencia de este canal en algunas

terminales nerviosas como las de las neuronas del núcleo medial del cuerpo trapezoide (MNTB) [Valeswara *et al.*, 2010], por otro lado también existen datos que indican la expresión del RNAm de este canal en neuronas piramidales de las capas II-III de la corteza somatosensorial [Guan *et al.*, 2006], lo cual concuerda con los datos obtenidos en este estudio, dado que precisamente las neuronas de la capa III de la corteza somatosensorial son uno de los tipos de neuronas que establecen sinapsis con las NEMs del estriado [Helie *et al.*, 2013]. En ese sentido, con base a estudios inmunohistoquímicos, también se tiene reportado la presencia del Kv1.6 en distintas regiones de los GB de rata, tales como el núcleo accumbens, el núcleo subtalámico, la sustancia nigra pars reticulata y el núcleo caudado-putamen [Yoon *et al.*, 2000] en donde este canal se ha identificado en las dendritas de las NEMs [Michelle *et al.*, 2008], lo cual nos indica que este canal se encuentra tanto a nivel presináptico, como posiblemente a nivel postsináptico en la sinapsis corticoestriatal.

El Kv1.6 puede expresarse en las células como un canal homomultimérico, o como un heteromúltimero asociándose principalmente con las subunidades Kv1.1, Kv1.2 y/o Kv1.4 [Harvey, 2001], cuando se forman estos heterotetrámeros basta con la presencia de alguna de estas subunidades para conferirle al canal la sensibilidad a la DTx [Kew y Davies, 2010]; por lo cual existe la posibilidad de que el Kv1.6 se encuentre formando un heterotetrámero con el Kv1.1 y/o el Kv1.4, pero no con el Kv1.2 ya que de acuerdo a nuestros datos este último canal no se encuentra en la terminal corticoestriatal.

### **Aplicación de todas las toxinas.**

Los canales que se trataron de identificar en esta segunda serie de experimentos fueron el Kv1.3, el Kv1.1, el Kv1.2 y el Kv1.6, en ese orden, de acuerdo a la secuencia de las toxinas que fueron aplicadas dependiendo de los canales que se bloqueaban previamente (Ver Figura 12). A continuación se analizará y discutirá la presencia de dichos canales de acuerdo a la aplicación de cada bloqueador.



### ***Identificación del Kv1.3 con MgTx***

En primera instancia, el empleo de 10 nM de MgTx produjo diferencias significativas en la disminución de la FPP entre este primer tratamiento y el control, lo cual corrobora la presencia del Kv1.3 en la terminal de las neuronas piramidales que establecen sinapsis con las NEMs del estriado, esto concuerda con los datos obtenidos a través de experimentos de co-inmunoprecipitación en el cerebro de mamífero, lo cuales señalan que este canal se encuentra altamente expresado en las neuronas corticales [Rhodes *et al.*, 1997]. También con base a diversas investigaciones se sabe que el Kv1.3 está involucrado a nivel presináptico en la liberación de neurotransmisores, tal como lo reportan los trabajos realizados por Valeswara-Rao y colaboradores (2010) en donde se muestra que el Kv1.3 está presente en las terminales presinápticas de las neuronas auditivas del tronco cerebral y que regula la liberación de neurotransmisores en neuronas que responden a diferentes frecuencias de sonido, o los realizados por Ohno-Shosakua y su grupo (1996) donde ellos concluyen que el Kv1.3 participa presinápticamente en la liberación de GABA en cultivos de células hipocámpales de rata, acorde a estos datos se suman nuestros resultados que indican que en la sinapsis corticoestriatal el Kv1.3 también participa a nivel presináptico en la liberación de glutamato, regulando así la excitabilidad neuronal del circuito corticoestriatal. Por otro lado también es importante señalar que, con base a pruebas inmunohistoquímicas en cerebro de rata se sabe que el Kv1.3 también se encuentra en distintas regiones de los GB, tales como el STN, el GP, el núcleo accumbens, la SNr y principalmente en el complejo caudado-putamen [Yoon *et al.*, 2000], lo cual abre la posibilidad de que en dado caso de que este canal se ubicara en las dendritas de las NEMs, también pueda estar regulando la liberación de neurotransmisores a nivel postsináptico, sin embargo, para dilucidar esta nueva interrogante serían necesarios más estudios con el empleo de técnicas específicas para confirmar la presencia del Kv1.3 en la postsinapsis.

### ***Determinación de la ausencia del Kv1.2 en la terminal corticoestriatal con TyTx.***

La aplicación de 10 nM de TyTx en presencia de MgTx no produjo cambios significativos en la FPP y dado la especificidad de la TyTx por los Kv1.2 [Werkman *et al.*, 1993] podemos decir que estos resultados no fueron alterados por el bloqueo de los Kv1.3 por la HgTx. El ligero cambio de DPP producido por la aplicación de TyTx (Ver figura 12), resulto no ser estadísticamente significativo, lo cual sugiere que es posible que el Kv1.2 no se encuentre en la terminal de la sinapsis corticoestriatal modulando la liberación de glutamato. Estos resultados son similares por los obtenidos por Torres (2007), en donde se concluye que el canal Kv1.2 no se encuentra en la terminal presináptica del circuito corticoestriatal modulando la liberación de neurotransmisores. Del mismo modo Korngreen y Sakman (2000) muestran que la aplicación de distintos bloqueadores del canal Kv1.2 (TyTx y MgTx) en neuronas neocorticales de la capa V en preparación de cerebro de rata no producen ningún efecto sugiriendo la ausencia de este canal en estas células, que como ya se señaló, son uno de los tipos de neuronas que conectan con las NEMs del estriado estableciendo la sinapsis corticoestriatal [Helie *et al.*, 2013]. Por otro lado, se tiene reportado que este miembro de los Kv1 se encuentra principalmente en las terminales nerviosas de distintas neuronas en diversas regiones del cerebro de mamífero [Vacher *et al.*, 2008] en donde contribuye, junto con el Kv1.1 y Kv1.3, a la liberación de neurotransmisores [Saria y Fischer, 1999]. El Kv1.2 también se han identificado en distintas regiones del axón, por ejemplo en la zona yuxtaparanodal de axones mielinizados [Wang *et al.*, 1993] y en la parte distal del segmento inicial del axón. Es importante tomar en cuenta que los Kv1.2 muestran una compleja y diferencial distribución subcelular dependiendo del tipo de células en las que se encuentren, por ejemplo, en neuronas hipocámpales, piramidales y células de Purkinje estos canales están concentrados en las dendritas mientras que en las neuronas de canasta del cerebelo se encuentran predominantemente, pero no exclusivamente, en las terminales nerviosas. Esta distribución diferencial es debida a que los Kv1.2 pueden asociarse con varias subunidades de los Kv1 formando complejos

heterólogos con distintas propiedades que les permiten jugar diversos roles en varios compartimentos neuronales de acuerdo a las funciones propias de cada célula, regulando la excitabilidad de la membrana [Sheng *et al.*, 1994]. En base a esto surge la posibilidad de que la no detección del Kv1.2 en la terminal corticoestriatal se deba a que el Kv1.2 se encuentre combinado con otras subunidades de los Kv1 que impidan su expresión o activación, tal como lo señalan estudios de Shu y colaboradores (2007), en donde se muestra que en neuronas piramidales de la corteza de rata, los Kv1.2 están asociados con otras subunidades, principalmente la Kv1.4 $\alpha$  y la Kv $\beta$ 1, las cuales pueden inactivar al canal. Por otro lado también existe la posibilidad de que simplemente el Kv1.2 no se encuentre en la terminal presináptica, tal como lo indica Rhodes y colaboradores (1997), los cuales señalan que canales heterómeros Kv1.2 se encuentran principalmente en la zona de transición entre el axón y la terminal nerviosa, en donde contribuyen a la generación de la corriente remanente, pero que no precisamente se encuentran en la presinapsis.

### ***Identificación del Kv1.1 con HgTx.***

Después de bloquear los canales Kv1.3 y Kv1.2 con de MgTx y TsTx, se aplicó 10 nM de HgTx, lo que produjo cambios significativos en la PPF, lo cual parece confirmar la presencia del Kv1.1 en la terminal corticoestriatal ya que al estar bloqueados el Kv1.3 por la MgTx, y no mostrar ningún efecto la utilización de TyTx, indicándonos la ausencia del Kv1.2, el cambio en las respuestas sinápticas fue producido por la inhibición de las corrientes generadas por el único canal sensible a MgTx que no fue bloqueado previamente, es decir el Kv1.1. Este miembro de la subfamilia Kv1 está altamente expresado en el SNC de mamífero y se localiza principalmente en los axones y terminales nerviosas [Monaghan *et al.*, 2001] en donde contribuye a la liberación de neurotransmisores, tal y como lo indican estudios realizados en el hipocampo de rata, el Kv1.1 participa en la liberación de glutamato en las terminales talamocorticales [Vacher *et al.*, 2008]. También se tiene reportado que la inhibición de las conductancias de K<sup>+</sup> de bajo umbral producidas por el Kv1.1 produce el aumento en la liberación de glutamato

en sinaptosomas de la corteza [Lambe y Aghajanian, 2001]. Por otra parte, experimentos con anticuerpos asociados a distintas subunidades de los Kv1 demostraron que el Kv1.1 se encuentra fuertemente expresado en las eferentes estriatales del GP y la SNr en ausencia del Kv1.2 [Rhodes *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1994], hecho que concuerda con la presencia del Kv1.1 y la ausencia del Kv1.2 en la terminal corticoestriatal reportada en el presente trabajo. Estos resultados son consistentes con los nuestros y subrayan el papel del Kv1.1 en la excitabilidad neural a través de la regulación de la liberación de neurotransmisores.

### ***Identificación de Kv1.6 con $\alpha$ DTx.***

Por último la aplicación de 100 nM de  $\alpha$ DTx en presencia de la MgTx (bloqueo del Kv1.3) así como de TyTx (Kv1.2 ausente) y HgTx (bloqueo del Kv1.1) produjo un aumento estadísticamente significativo en la DPP lo cual nos habla que este cambio en las amplitudes es provocado por la inhibición de la corriente del Kv1.6, que con base al orden de aplicación y selectividad de las toxinas, fue el último canal bloqueado. Los resultados obtenidos de estos experimentos (MgTx+TyTx+HgTx+DTx) concuerda con los datos obtenidos en las pruebas donde se utilizaron HgTx+DTx, ya que en ambos ensayos se confirma la presencia del Kv1.6 en la sinapsis corticoestriatal y su participación en la modulación de glutamato, hecho que ya fue analizado y discutido anteriormente a partir de los datos obtenidos del bloqueo de HgTx+  $\alpha$ DTx

### **Implicaciones fisiológicas de la presencia del Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6 en la terminal corticoestriatal y su participación en la liberación de neurotransmisores.**

En general los canales de la subfamilia Kv1 están involucrados en la regulación, integración y transmisión de las señales eléctricas en el sistema nervioso [Lichtinghagen *et al.*, 1995], juegan un papel crítico en el control de la despolarización en las terminales nerviosas y modulan la liberación de neurotransmisores [Rhodes *et al.*, 1997]. La función de cada miembro de esta

subfamilia puede variar dependiendo de la conformación del canal, su ubicación subcelular, o del tipo de célula en la que se encuentre, de tal modo que existe una expresión diferencial de las distintas subunidades Kv1 en base a estos factores, por lo tanto la localización de estas subunidades en las terminales nerviosas y otras áreas subcelulares no marcan un patrón específico de distribución [Meir *et al.*, 1999], en el caso de esta investigación, nuestros resultados confirman la presencia de los canales Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6 en la terminal corticoestriatal, lo cual tiene distintas implicaciones a nivel fisiológico ya que estos canales influyen de manera directa a la transmisión sináptica, está documentado que los tres canales que fueron identificados en este trabajo tienden a combinarse para formar heterotetrámeros [Harvey, 2001] los cuales se encargan del control de la excitabilidad en la terminal axónica previniendo así disparos aberrantes [Rudy *et al.*, 2009]. Asimismo, también están fuertemente involucrados en la liberación de neurotransmisores en distintas terminales nerviosas [Lambe y Aghajanian, 2001; Vacher *et al.*, 2008], dada las funciones de las que se encargan estos canales, es razonable pensar que de igual manera que en otros circuitos, estos miembros de los Kv1 son responsables de modular la actividad eléctrica en la sinapsis corticoestriatal, mediante la inhibición de las terminales nerviosas y de la regulación en la entrada de  $Ca^{2+}$  presináptico a través de la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Dado que el circuito corticoestriatal se encarga de recibir, integrar y transmitir las señales excitatorias (glutamatérgicas) para que en conjunto con el resto de los núcleos de lo GB se logre el correcto funcionamiento motor, es necesario que en esta sinapsis existan mecanismos de control en la excitabilidad nerviosa, puesto que la falta de estos mecanismos pueden provocar distintas neuropatologías motoras, tal como lo indican estudios clínicos en humanos, en los cuales, mutaciones en algunos de los canales encontrados en este trabajo, tal como el Kv1.1 producen distintos tipos de epilepsia, y mioclonias [Rudy *et al.*, 2009]. Con base a ello, se sugiere que los canales Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6 contribuyen a la generación de estos mecanismos de regulación en la excitabilidad neuronal que la sinapsis corticoestriatal necesita para la correcta transmisión sináptica de este circuito.

## Conclusiones.

La subfamilia de canales de potasio Kv1 juegan un papel crítico en el control de la excitabilidad modulando presinápticamente la liberación de glutamato en las aferentes corticoestriatales de rata; ya que la aplicación extracelular de distintos bloqueadores de estos canales produjo una disminución en la FPP o un aumento en la DPP, es decir un incremento en la probabilidad de liberación del neurotransmisor cuando los canales Kv1 se encuentran inhibidos, esto ocurre porque los Kv1 regulan la despolarización para atenuar la excitabilidad de la membrana, pero al encontrarse bloqueados permiten que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se abran y por consiguiente entre más  $\text{Ca}^{2+}$  a la terminal presináptica contribuyendo a que haya liberación de neurotransmisores.

Esta liberación de neurotransmisores es críticamente dependiente de la duración de potenciales de acción en la terminal presináptica. Dicha liberación es significativamente incrementada al bloquear los canales de  $\text{K}^+$  de la subfamilia Kv1.

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio a través de experimentos de oclusión farmacológica empleando distintos bloqueadores de los canales Kv1 se sugiere que al menos tres miembros de los canales de la familia Kv1 (Kv 1.1, Kv 1.3 y Kv 1.6) están presentes en la terminal corticoestriatal de la rata, debido a que produjeron una disminución en el índice de la FPP después de la aplicación de HgTx, MgTx y  $\alpha\text{DTx}$ , a excepción del Kv1.2 el cual probablemente no se encuentre en la sinapsis corticoestriatal ya que no se observó ningún efecto estadísticamente significativo al aplicar un bloqueador específico para este canal (TyTx). Los canales Kv1 son una de las subfamilias más importantes dentro del Kv ya que están involucrados de manera directa en la modulación de la excitabilidad en las terminales sinápticas y participan en la liberación de neurotransmisores influyendo así en la regulación de la transmisión sináptica.

## LITERATURA CITADA.

1. Alexander S, Mathie A, Peter S. 2004. Potassium channels, in Guide to receptors and channels. J. Pharmacology 141: 583-584.
2. Andrew R, Dudek F. 1985. Spike broadening in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamic slices. Brain Research 1: 176-179.
3. Ashcroft F. 1999. Ion Channels and Disease, channelopathies. Academic Press. USA. 97-247 pp.
4. Bargas J, Ayala G, Hernández E, Galarraga E. 1998. Ca<sup>2+</sup> Channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. Brain Research 45: 521- 524.
5. Barhanin J, Giglio J, Leopold P, Schmid A, Vilela S, Sampaio S, Lazdunski M. 1982. *Tityus serrulatus* Venom Contains Two Classes of Toxins *Tityus* y toxin is a new tool with a very high affinity for studyg the Na channel. Journal Biological chemistry 257: 12553-12558.
6. Barral J, Galarraga E, Bargas J. 1999. Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. Brain Research 49:285-289.
7. Barral J, Mendoza E, Galárraga E, Bargas J. 2003. The presynaptic modulation of corticostriatal afferents by mu-opioids is mediated by K+ conductances. Journal Pharmacology 462: 91-98.
8. Barral J, Toro S, Galarraga E, Bargas J. 2000. GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca channels. Neuroscience Letters 283:33-36
9. Barral J. 2001. Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatérgicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM.
10. Blankenship J. 2003. Neurophysiology. Mosby Inc. Philadelphia, Pennsylvania. 15-17, 50-57 pp.
11. Bogin O. 2006. Venom Toxins as Ion Channel Research Tools. Modulator 21-28.

12. Bowden S, Yeung S, Robertson B. 2002. Pharmacology of voltage-gated K channels. *Tocris review* 22.
13. Brodal P. 1992. The central Nervous system. Structure and function. Oxford. 495 pp.
14. Brown D, Rothery P. 1993. Statistical Methods for comparing biological populations and processes. *Model in Biology: mathematics, statistics and computing*. The bath press, Avon Great Britain. 199-235pp.
15. Buckingham S, Kidd J, Law R, Franks C, Satelle D. 2005. Structure and function of two-pore-domain KC channels: contributions from genetic model organisms. *TRENDS in Pharmacological Science* 7:361-7
16. Bustamante E. 2007. El Sistema nervioso: Desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 305 pp.
17. Byrne J, Roberts L. 2004. From Molecules to Networks: An Introduction to cellular and molecular neuroscience. Elsevier Academic Press. 245-250 pp.
18. Calabresi P, Pisani A, Mercuri N, Bernardi G. 1996. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neuroscience* 19: 19-24.
19. Cardinali D. 1992. Manual de neurofisiología. Ediciones Díaz de santos. Madrid. 339 pp.
20. Cardinali D. 2007. Neurociencia aplicada: sus fundamentos, Ediciones Médica Panamericana, Argentina. 503 pp.
21. Choe S. 2002. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 115-121.
22. Coetzee W, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal M, Ozaita A, Poutney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. 1999, Molecular Diversity of K<sup>+</sup> Channels. *Annal New York Academic of Science* 233-285.
23. Daniel W. 2002. Estadística no paramétrica y de libre distribución. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 4<sup>a</sup> ed. Limusa Wiley. 658-737pp.



24. Debanne D, Guérineau M, Gähwiler B, Thompson S. 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release. *Journal Physiology* 491: 163-176.
25. Del-Castillo J, Katz B. 1954a. Quantal components of the end-plate potential. *Journal Physiology* 124:560-573.
26. Del-Castillo J, Katz B. 1954b Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *Journal Physiology* 124:574-585.
27. Devan B, Hong N, McDonald R. 2011. Parallel associative processing in the dorsal striatum: segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. *Neurobiology of learning and memory* 96: 95-120.
28. Dodson P, Billups B, Rusznák Z, Szúcs G, Barker M, Forsythe I. 2003. Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *Journal Physiology* 1:27-33
29. Dodson P, Forsythe I. 2004. Presynaptic K<sup>+</sup> channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends in Neuroscience* 4:220-217.
30. Dougherty J, Wu J, Nichols R. 2003. Amyloid Regulation of Presynaptic Nicotinic Receptors in Rat Hippocampus and Neocortex. *Journal Neuroscience* 17: 6740-6747.
31. Dunwiddie T, Hass H. 1985. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: Evidence for a presynaptic site of action. *Journal Physiology* 369:365-377.
32. Engelman H, MacDermott B. 2004. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nature Review* 5:135-145.
33. Flores-Hernández J, Galarraga E, Bargas J. 1997. Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse* 25: 185-195.
34. Fry M, Maue R, Moody-corbett F. 2004. Properties of *Xenopus* K<sub>V</sub>1.10 channels expressed in HEK293 cells. *Journal Neurobiology* 60:227-235.

35. Galárraga E, Bargas J. 1998. Multiplicidad de conductancias iónicas en las células excitables. En: Muñoz-Martínez EJ, García X. Compiladores fisiología células, órganos y sistemas. Tomo I Fisiología Celular. Comunicación intercelular. Ediciones Científicas Universitarias. Serie Texto Científico Universitario. Secretaría de Salud. UNAM. CINVESTAV. IMSS. SMCF. FCE. México.
36. Garcia-Calvo M, Leonard P, Novek J, Stevens S, Schmalhofer W, Kaczorowski G, Garcia M. 1993. Purification, characterization and biosynthesis of Margatoxin a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *Journal Biological chemistry* 25: 18866-18874.
37. Gazzaniga M, Ivry R, Mangun G. 1998. Cognitive Neuroscience. The Biology of the Mind. W.W. Northon&Company USA. 42-44, 56-58, 375-378 pp.
38. Gerfen Ch, Bolam J. 2010. The neuroatomical organization of the basal ganglia. En: Handbook of Basal Ganglia, structure and function. Elsevier. 4-6 pp.
39. Graybiel A. 2004. Network level neuroplasticity in cortico-basal ganglia path-ways. *Parkinsonism Real Disorder* 10:293-296.
40. Graybriel A. 1990. The basal ganglia and the initiation of the movement. *Review Neurology* 10:570-4.
41. Gu Ch, Barry J. 2011. Function and mechanism of axonal targeting of voltage sensitive potassium channels. *Progress in Neurobiology* 94: 115-132.
42. Guan D, Lee F, Katch T, Surmeier J, Armstrong E, Foehring C. 2006. Espressionans biophysical properties of Kv1 channels in supragranular neocortical pyramidal neurones. *Journal Phisiology* 571: 371-389.
43. Gutman A, Chandy G, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo A, Robertson G, Rudy B, Sanguinetti, M, Stuhmer W, Wang X. 2005. International Union of Pharmacology. L. III. Nomenclature and Molecular

- Relationship of Voltage Gated Potassium Channels Pharmacology. Pharmacology Review 57: 473-508.
44. Gutman G, Chandy K, Adelman J, Aiyar J, Bayliss D, Clapham D, Covarrubias M, Desir G, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia M, Grissmer S, Jan L, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester H, Mckinnon D, Nichols C, O'kelly I, Robbins J, Robertson G, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun M, Vandenberg C, Wei A, Wulff H, Wymore R. 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels. Pharmacology 4: 583-586.
  45. Hammond C. 2001. Cellular and Molecular Neurobiology. 2<sup>da</sup> ed. Academic Press. San Diego. 188-214 pp.
  46. Harvey, A. 2001. Twenty years of dendrotoxin. Toxicon 39: 15-26.
  47. Helie S, Chakravarthy S, Moustafa A. 2013. Exploring the cognitive and motor functions of basal ganglia: an integrative review of computational cognitive neuroscience models. Frontiers in computational Neuroscience 7:1-16.
  48. Hernández-Echeagaray E. 1998. La modulación colinérgica de las aferentes glutamatérgicas el estriado. Tesis de Doctorado. UNAM-UACPyP. México.
  49. Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3<sup>a</sup> ed. Sunderland, MA: Sinauer. 788 pp.
  50. Isaacson J, Walmsley B. 1995. Counting quanta: direct measurements of transmitter release at a central synapse. Neuron 15:875-884.
  51. Johnston D, Wu S. 1995. Foundations of cellular neurobiology, MIT Press, Cambridge. Mass. 287-391pp.
  52. Judge S, Bever C. 2006. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal K<sub>v</sub> channels and effects of symptomatic treatment. Pharmacology and therapeutics 111:224- 259.
  53. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. 2000. Principles of Neural Science. 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill. USA. 175-298 pp.

54. Katz B, Miledi R. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *Journal Physiology* 195:481-492.
55. Katz B, Miledi R. 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *Journal Physiology* 207:789-801.
56. Kawaguchi T. 1993. Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. *Journal Neuroscience* 13: 4908-4923.
57. Kew J, Davies C. 2010. *Ion channels: from structure to function*. Oxford university press. 562 pp.
58. Kita, H. 1993. GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Research* 99:51-72.
59. Korngreen A, Sakmann B. 2000. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in layer V neocortical pyramidal neurones from young rats: subtypes and gradients. *The Journal of physiology* 3: 621-639.
60. Koschak A, Bugianesi R, Mitterdorfer J, Kaczerweski G, Garcias M, Knaus H. 1998. *The journal of biological Chemistry* 273:2639-2644.
61. Lambe E, Aghajanian G. 2001. The role of Kv1.2 containing potassium channels in serotonin-induced glutamate release from thalamocortical terminals in rat frontal cortex. *Journal Neuroscience* 24: 9955-63
62. Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach I, Pongs O. 1995. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channels subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localization in rat brain. *Euro Journal Neuroscience* 11: 2189-205.
63. López H, Brown A. 1992. Neuromodulation *Current. Opin. Neurobiology* 2: 317-322.
64. Lovinger D, Tyler E. 1996. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Review Neurobiology* 39: 77-111.
65. Lujuan R, Cabo de la Vega C, Dominguez del Toro E, Ballesta J, Criado M, Juiz J. 2003. Immunohistochemical localization of voltage-gated potassium channel subunit Kv1.4 in the central nervous system of the adult rat. *Journal Chemical neuroanatomy* 26: 209-224.

66. Martel P, Leo D, Fulton S, Berand M, Trudeau L. 2011. Role of Kv1 Potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS one* 6:5.
67. Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky S, Kaiserman I, Ahdut R, Demiregoren, S. Rahamimoff R. 1999. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Journal Physiology Review* 79: 1019-1088.
68. Mennerick S, Zorumski C. 1995. Paire-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons. *Journal Physiology* 488:85-101.
69. Micheli E. 2006. Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. Ed. Médica Panamericana. 628 pp.
70. Micheli F, Luquin-Piudo M. 2012. Movimientos anormales. Clínica y terapéutica. MedicaPanamericana. Buenos Aires. 606 pp.
71. Michelle D, Wokosin D, Plotkin J, Xinyoung T, Sumeier J. 2008. Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *Journal Neuroscience* 45: 11603-11614.
72. Miller C. 1995. The Charybdotoxin Family of K<sup>+</sup> Channel-Blocking Peptides. *Neuron* 15:5-10.
73. Miller R. 1998. Presynaptic receptors. *Review Pharmacology Toxicology* 38: 201-227.
74. Monaghan M, Trimmer J, Rhodes K. 2001. Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *Journal Neuroscience* 12: 5973-5985.
75. Ojeda J, Icardo J. 2004. Neuroanatomía humana. Aspectos funcionales y clínicos. Elsevier Masson. Barcelona, España. 308 pp.
76. Onho-Shosakua T, Kim I, Sawida S, Yamamoto C. 1996. Presence of voltage-gated potassium channels sensitive to charybdotoxin in inhibitory presynaptic terminals of cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters* 207: 195-198.

77. Papazian D. 1999. Potassium Channels: Some Assembly Required. *Neuron* 23:7-10.
78. Quian J, Saggau P. 1999. Activity-dependent modulation of K<sup>+</sup> currents at presynaptic terminals of mammalian central synapses. *Journal of Physiology* 2:427-437.
79. Rappuola R, Montecucco C. 1997. Guidebook to protein toxins and their use in cell Biology. Oxford university press. 274 pp.
80. Reiner A, Medina L, Veenman C. 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Research Review* 28: 235-285.
81. Rhodes K, Strassli B, Monaghan M, Bekele A, Mate M, Trimmer J. 1997. Association and colocalization of the Kv beta 1 and Kv beta 2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain Kc channels complexes. *Journal neuroscience* 17:46-58.
82. Richards D, Morrone L. 1999. Extracellular glutamate levels following intrahippocampal infusion of  $\alpha$ dendrotoxin and dendrotoxin-K in the rat. *British journal of pharmacology* 6:153.
83. Robbins C, Tempel B. 2012. K<sub>v</sub>1.1 and K<sub>v</sub>1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* 1:134-141.
84. Roeper J, Pongs O. 1996. Presynaptics Potassium channels. *Current opinión Neurobiolog.* 6:338-341.
85. Rosenzweig M, Breedlove S, Watson N. 2005. *Biological Psychology an Introduction to Behavioral and Cognitive Neuroscience* 4<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates Publishers. Sunderland Massachusetts USA. 29, 54-56, 69-70, 78-83 pp.
86. Rudy B, Maffie J, Amarillo Y, Clark B, Goldberg E M, Jeong H -Y, Kruglikov I, Kwon E, Nadal M and Zaghera E. 2009. Voltage Gated Potassium Channels: Structure and Function of Kv1 to Kv9 Subfamilies. Elsevier Ltd. 10:397-425 pp.
87. Saria A, Seidl C, Fischer H, Koch R, Telser S, Wanner S, Humpel C, Garcia M, Knaus H. 1998. Margatoxin increases dopamine release in rat

- striatum via voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Euro Journal Pharmacology* 343:193-200.
88. Saria A, Fischer H. 1999. Voltage gated, Margatoxin-sensitive potassium channels, but not calcium-gated, Iberotoxin- sensitive potassium channels modulate acetylcholine release in rat striatal slices. *Neuroscience letters* 263: 208-210.
  89. Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, Dehn D, Deller T, Eble S, Abbass K, Wangler T, Knaus HG, Fakler B. 2006. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by K $\beta$ 1. *Neuron* 49:697-706.
  90. Shen W, Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Held JE, Surmeier DJ. 2004. Kv1.2-containing K<sup>+</sup> channels regulate subthreshold excitability of striatal medium spiny neurons. *Journal Neurophysiology* 3:1337-49.
  91. Sheng M, Tsaur M, Jan Y, Jan L. 1994. Contrasting subcellular localization of the Kv1.2 K<sup>+</sup> channel subunit in different neurons of rat brain. *Journal Neuroscience* 4: 2408-2417.
  92. Shepherd G. 2004. *The synaptic organization of the brain*. 5<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. USA. 719 pp.
  93. Shimada H, Uta D, Nabekura J, Yoshimura M. 2007. Involvement of Kv channel subtypes on GABA release in mechanically dissociated neurons from the rat substantia nigra. *Brain Research* 13: 74-83.
  94. Shing H, Chung O, Andersen S, Krishnamurthy V. 2007. *Biological membrane ion channels. Dynamics, structures and applications*. Springer. 658pp.
  95. Shu Y, Yu Y, Yang J, McCornick D. 2007. Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K<sup>+</sup> current. *Proc Natf Acad Science* 104: 11453-11458.
  96. Siegel G, Alberts R, Brady S, Price D. 2006. *Basic Neurochemistry Molecular, Celular and Medical Aspects*. 7<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press. Canada.167-168, 761-766 pp.

97. Smith A, Bolam J. 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neuroscience* 13: 7.259-65.
98. Southan A, Robertson B. 2000. Electrophysiological characterization of voltage-gated K<sup>+</sup> currents in cerebellar basket and Purkinje cells: Kv1 and Kv3 channel subfamilies are present in basket cell nerve terminals. *Journal Neuroscience* 20: 114–122.
99. Tepper J, Bolam J. 2004. Funcional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opin Neurobiology* 14: 685-692.
100. Torres F. 2007. Participación de los canales de potasio presinápticos en la sinapsis cortico-estriatal de rata mediante el empleo de bloqueadores específicos. Tesis Licenciatura. FESI. UNAM.
101. Utsunomiya I, Eikichi Y, Shinya T, Yoshihiko N, Hideki I, Tadashi M, Keiko H, Kyoyi T. 2008. Expression and localization of Kv1 potassium channels in rat dorsal and ventral spinal roots. *Experimental neurology* 210:51-58.
102. Vacher H, Mohapatra D, Trimmer J. 2008. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiology Review* 4:1407-47.
103. Valeswara-Rao G, Strumbos G, Mei X, Chen H, Rahner C, Kaczmarek L. 2010. Localization of Kv1.3 channels in presynaptic terminals of brainstem auditory neurons. *Journal Comp Neurology* 16: 3205–3220.
104. Walmsley B, Álvarez F, Fyffe J. 1998. Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Review TINS* 21: 81-88.
105. Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. 1993. Heteromultimeric K<sup>+</sup> channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365:75-79.
106. Werkman T, Gustafson T, Rogowski R, Blaustein M, Rogawski M. 1993. Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K<sup>+</sup> channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1.2 K<sup>+</sup> channel. *Mol Pharmacology* 2: 430-6.



107. Wilcox S, Dichter A. 1994. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA<sub>B</sub> autoreceptor activation. *Journal Neuroscience* 3: 1775-1788.
108. Wilson C. 1998. The Basal Ganglia. In: Shepherd, G.M. (Ed) *The synaptic organization of the brain*. 4<sup>a</sup> Ed. Oxford University press. N.Y. 329-375pp.
109. Wilson C. 2004. The Basal Ganglia. En: Shepherd, G.M. (Ed) *The synaptic organization of the brain*. 5<sup>a</sup> Ed. Oxford University press. N.Y. 719 pp.
110. Wulff H, Castle N, Pardo L. 2009. Voltage gated potassium channels as therapeutic drug targets. *Nature Review Drug Discover* 12: 982-1001.
111. Yoon H, Chung-min S, Myeung J, Choong I. 2000. Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channels subfamily in the rat basal ganglia. *Brain research* 875: 164-170.