

46
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA SOMATOSTATINA REGULA LA FRECUENCIA TEMPORAL DE DISPARO EN LAS NEURONAS ESTRIATALES A TRAVÉS DE LA MODULACION DEL POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

EMILIO JAVIER GALVAN ESPINOZA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO



MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27/11/99



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

La somatostatina regula la frecuencia temporal de disparo en las neuronas estriatales a través de la modulación del postpotencial hiperpolarizante.

realizado por Emilio Javier Galván Espinoza

con número de cuenta 8921512-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dra. Elvira Galarraga Palacio

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul de M.

Propietario

Dra. Hortensia González Gómez

Suplente

M. en C. Jaime Eduardo Calixto González

Suplente

Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEDICATORIA

Con mucho cariño a Papá y Mamá (**Teresa y Emilio**) por haberme brindado su apoyo total e incondicional durante todo este tiempo.

A **Héctor** mi hermano, por estar siempre dispuesto a resolverme cualquier ecuación.

Y finalmente a mi abuela **Gabina**, por mostrarme desde pequeño tantos y tantos libros.

AGRADECIMIENTOS

A MAIRA

Obvio .. obvio...

Y mis amigos incondicionales en el IFICE:

Ale, compañera inseparable de laboratorio, de experimentos, de soluciones y de horribles comidas en días de trabajo.

Quiquín, por tantas horas de amena convivencia, discutiendo artículos, y hasta en el los momentos más grotescos (¡gracias quiquín!).

Cesar y Lalo (*Primitive*), por todos los fieros retratos logrados en tan poco tiempo (masterworks) y su amistad total e incondicional.

A **Beto** por ser del bando de los técnicos (de laboratorio) y enseñarme pacientemente todo lo que necesitaba saber.

Y **Carmen V.** mi amiga, por compartir un proyecto muy interesante, artículos, y todo tipo de seminarios.

Finalmente, *The Yuppies Networking...* J. Atwood en Arkham (y el libro eterno), Charles Angeles (muchos viajes y muchas clases), Dr. Gene Castellanos (mi querido carnalito), El Tigre Gaytan (por ser tan tigre), Cochipuerk Alrube (por tantos años de amistad), Marjorie G. (por revoltosa), Monica I. (mi amiga) Carlí R (nada más por ser Carlí 3-F), Araceñi B., Xavier M. Y por supuesto...

A mi siempre H. Facultad de Ciencias de la
Universidad Nacional Autónoma de México

M i A l m a M a t e r

A los sinodales que amablemente revisaron y corrigieron este trabajo

Dra. Elvira Galarraga Palacio

Dra. Ma. Luisa Fanjul

Dra. Hortensia González

M. en C. Eduardo Calixto

Q. Silvestre Alavez

PARÉNTESIS

¿Por qué será tan atractivo -pensaba el Mono en otra ocasión cuando le dio por la literatura- y al mismo tiempo como tan sin gracia ese tema del escritor que no escribe, o el del que se pasa la vida preparándose para producir una obra maestra y poco a poco va convirtiéndose en mero lector mecánico de libros cada vez más importantes pero que en realidad no le interesan, o el socorrido (el más universal) del que cuando ha perfeccionado un estilo se encuentra con que no tiene nada que decir, o el del que entre más inteligente es, menos escribe, en tanto que a su alrededor otros quizá no tan inteligentes como él y a quienes él conoce y desprecia un poco publican obras que todo el mundo comenta y que en efecto a veces son hasta buenas, o el del que en alguna forma ha logrado fama de inteligente y se tortura pensando que sus amigos esperan de él que escriba algo, y lo hace, con el único resultado de que sus amigos empiezan a sospechar de su inteligencia y de vez en cuando se suicida, o el del tonto que se cree inteligente y escribe cosas tan inteligentes que los inteligentes se admiran, o el del que ni es inteligente ni tonto ni escribe ni nadie conoce ni existe ni nada?

**LA SOMATOSTATINA REGULA LA FRECUENCIA
TEMPORAL DE DISPARO EN LAS NEURONAS
NEOESTRIATALES A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DEL
POSTPOTENCIAL HIPERPOLARIZANTE**

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Elementos neuronales del neoestriado.....	7
La neurona espinosa mediana.....	7
Interneuronas.....	8
Interneuronas Colinérgicas.....	8
Interneuronas GABAérgicas.....	8
Interneurona Somatostatinérgica/NOS.....	9
La Somatostatina en el Sistema Nervioso Central.....	11
Receptores de Somatostatina.....	17
Disparo Neuronal.....	19
Postpotencial hiperpolarizante.....	21
El papel del Ca^{2+} en el disparo neuronal.....	23
Planteamiento del problema.....	25
Objetivos.....	25
Material y Método.....	26
Protocolos experimentales.....	27
Protocolo experimental 1.....	27
Protocolo experimental 2.....	27
Protocolo experimental 3.....	28
Protocolo experimental 4.....	28
Resultados.....	29
Características electrofisiológicas de las neuronas del neoestriado.....	29
Efecto de la Somatostatina sobre el Postpotencial Hiperpolarizante en las neuronas del neoestriado...	34
Acción de la somatostatina sobre patrón temporal de disparo.....	34
Efecto de la somatostatina sobre el Potencial de Acción de Ca^{2+}	42
Efecto de la somatostatina sobre el PA de Ca^{2+} en presencia de TTX.....	43
Acción de la somatostatina sobre la R_N de las neuronas estriatales de proyección.....	45
Discusión.....	49
Características electrofisiológicas de las células registradas.....	49
Acción de la Somatostatina sobre la R_N de las neuronas estriatales de proyección.....	50
Efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante.....	51
Efecto de la somatostatina sobre el potencial de Ca^{2+}	52
Acción de la somatostatina sobre el patrón temporal de disparo de las neuronas de proyección.....	54
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58

Resumen

La somatostatina (SOM), un tetradecapéptido cíclico identificado originalmente como inhibidor de la liberación de la hormona de crecimiento (GH), es considerada en la actualidad como un neuropéptido con actividad moduladora y distribuido ubicuamente en el sistema nervioso central, donde se le atribuyen diversas acciones fisiológicas. El efecto genérico reportado para la SOM es disminuir las corrientes entrantes de Ca^{2+} y potenciar corrientes de K^+ .

En el neoestriado, la SOM es liberada por interneuronas y se desconoce la función fisiológica de este péptido sobre las neuronas de proyección que conforman el 90% de la población neuronal del núcleo. Para comenzar a estudiar el efecto modulador de la somatostatina en las neuronas estriatales de proyección se realizaron registros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de corriente en rebanadas de cerebro de rata mantenidas "in vitro". Diferentes protocolos de estimulación se utilizaron para evidenciar el efecto fisiológico de la somatostatina.

El postpotencial hiperpolarizante que sigue a cada potencial de acción, contribuye en la regulación de la frecuencia temporal de disparo de trenes de potenciales de acción y se encuentra modulado por la entrada de Ca^{2+} extracelular.

La aplicación de $1 \mu\text{M}$ de SOM al medio de perfusión produce una disminución de la amplitud del postpotencial hiperpolarizante y modifica la relación entrada-salida (intensidad de corriente de estimulación contra frecuencia de disparo) de estas neuronas, incrementando la frecuencia de disparo y/o haciéndola irregular (ráfagas). De igual manera la somatostatina disminuye la duración del potencial de calcio inducido por pulsos de corriente en presencia de TEA. Dicho efecto persiste al agregar TTX, lo que sugiere que el efecto de la somatostatina es directo sobre la neurona registrada. El efecto de la SOM a nivel subumbral fue de un incremento en la rectificación entrante acompañado por una disminución en la resistencia de entrada.

En conclusión, la acción fisiológica de la SOM sobre las neuronas espinosas medianas de proyección, incluye una disminución en la entrada de Ca^{2+} que, consecuentemente, modifica el patrón temporal de disparo y produce un aumento en la corriente de K^+ (rectificador entrante) la cual disminuye la excitabilidad de estas neuronas.

Introducción

En la región media y frontal del cerebro se alberga a los ganglios basales, una serie de núcleos altamente interconectados entre sí, que representan una de las estructuras subcorticales telencefálicas más prominentes que existen en el cerebro de los mamíferos. Los ganglios basales se componen de distintos núcleos: el caudado, putamen, globo pálido, sustancia nigra, y núcleo subtalámico.

La mayoría de las entradas a los ganglios basales provenientes de otras estructuras cerebrales arriban al *neostriado*, el cual consiste del núcleo caudado, putamen y acumbens (Wilson, 1998 en Sheperd Ed.).

El neostriado recibe proyecciones masivas de todas las áreas de la corteza (Ragsdale y Graybiel, 1990), centros monoaminérgicos del cerebro medio (Gerfen *et al.*, 1987) y del núcleo intralaminar del tálamo (Dubé *et al.*, 1988).

La salida del neostriado proyecta casi exclusivamente a 2 estructuras de los ganglios basales: estas se encuentran dirigidas principalmente a los segmentos externo e interno del globo pálido y a la *pars reticulata* de la sustancia nigra (Desban *et al.*, 1989; Gimenez-Amaya y Graybiel, 1990 Wilson, 1998.). Estas estructuras son muy similares en su organización celular. Tanto el segmento interno del globo pálido como la sustancia nigra proyectan a estructuras fuera de los ganglios basales y representan las vías de salida más importante de los mismos.

El segmento interno del globo pálido forma un importante canal de salida que envía proyecciones principalmente a la habénula lateral, el núcleo ventrolateral del tálamo y el núcleo pedunculopontino tegmental. La parte rostral del globo pálido en la rata proyecta a la habénula lateral que provee una larga entrada al núcleo raquídeo dorsal, una importante fuente de proyección serotoninérgica al neostriado. La parte caudal del globo pálido envía al tálamo y al tegmento pontino (Rajakumar *et al.*, 1993; Kalen *et al.*, 1989, en Rajakumar *et al.*, 1993); La figura 1 muestra un esquema de los ganglios basales y los diferentes núcleos que lo conforman (tomado de Sheperd, 1998).

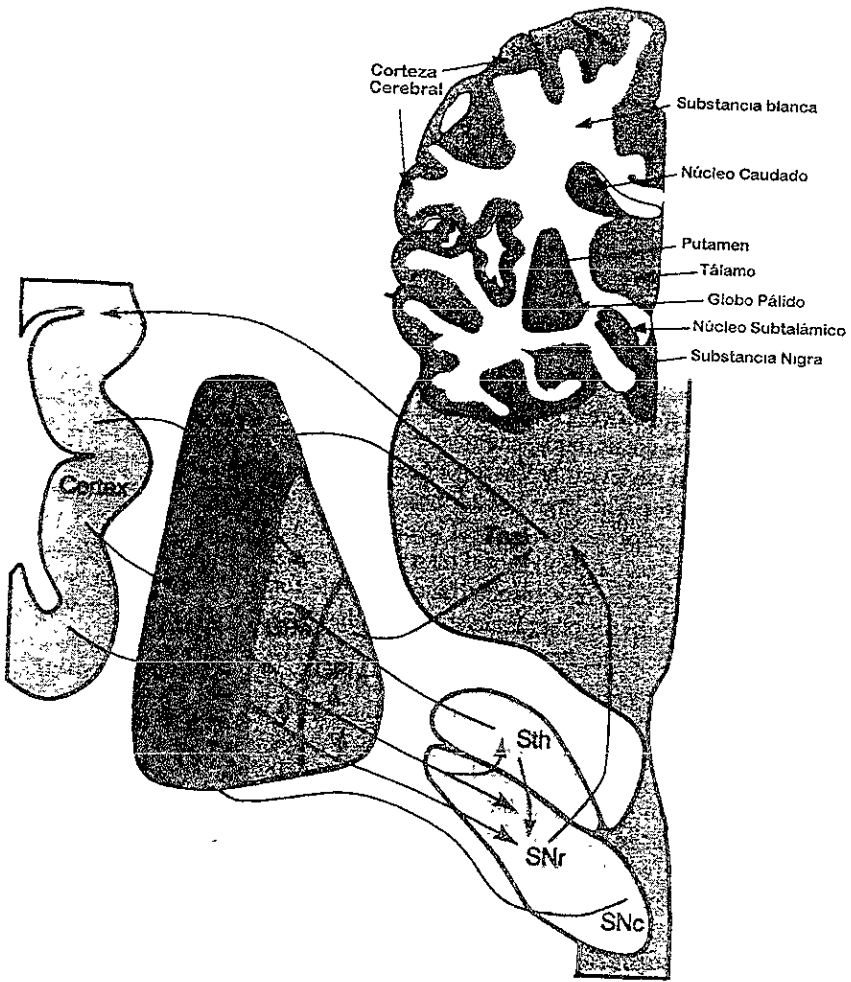


Figura 1.- De manera simplificada, el esquema muestra la organización general de los ganglios basales y los diferentes núcleos que lo conforman. GPe. Globo pálido externo; GPi: Globo pálido interno; Thal: Tálamo; Sth: Núcleo subtalámico; SNr: Substancia nigra, *pars reticulata*; SNC: Substancia nigra, *pars compacta* (Modificado de Shepard, 1998).

Las entradas corticales al neostriado son de naturaleza excitatoria y están mediadas por glutamato. La salida de los ganglios basales es a través de neuronas inhibitorias (GABAérgicas) del segmento interno del globo pálido al tálamo y entonces a través de vías excitatorias a la corteza premotora y motora. El procesamiento de las señales corticales en el neostriado involucra dos vías de salida principalmente (Garret *et al.*, 1994). La vía directa que se forma de proyecciones GABAérgicas inhibitorias que van del neostriado al segmento interno del globo pálido y la sustancia nigra reticulata. La activación de esta vía resulta entonces en la inhibición de las neuronas inhibitorias eferentes del globo pálido y por consiguiente en la desinhibición de las neuronas talámicas de relevo. Se ha postulado que esta vía facilita los movimientos a través de la excitación de las áreas corticales premotoras y suplementarias. La vía indirecta involucra un distinto subtipo de neuronas estriatales GABAérgicas que proyectan al segmento externo del globo pálido e inhiben las proyecciones GABAérgicas que van al núcleo subtalámico, en el cual existen neuronas excitatorias (glutamatérgicas) que proyectan al segmento interno del globo pálido y proveen excitación a las neuronas eferentes palidotálámicas GABAérgicas. El efecto final de la activación de esta vía es la supresión de la actividad de las neuronas talámicas de relevo, inhibición de las neuronas corticales motoras e inhabilitación del movimiento. La figura 2 es un esquema simplificado de las vías aferentes y eferentes de los ganglios basales.

La actividad de las dos vías parece ser modulada por el lazo interno dopaminérgico existente entre el neostriado y la sustancia nigra, probablemente con la asistencia de interneuronas colinérgicas (que liberan acetilcolina) presentes en el neostriado, así como por otras interneuronas neostriatales (GABAérgicas y Somatostatinérgicas)

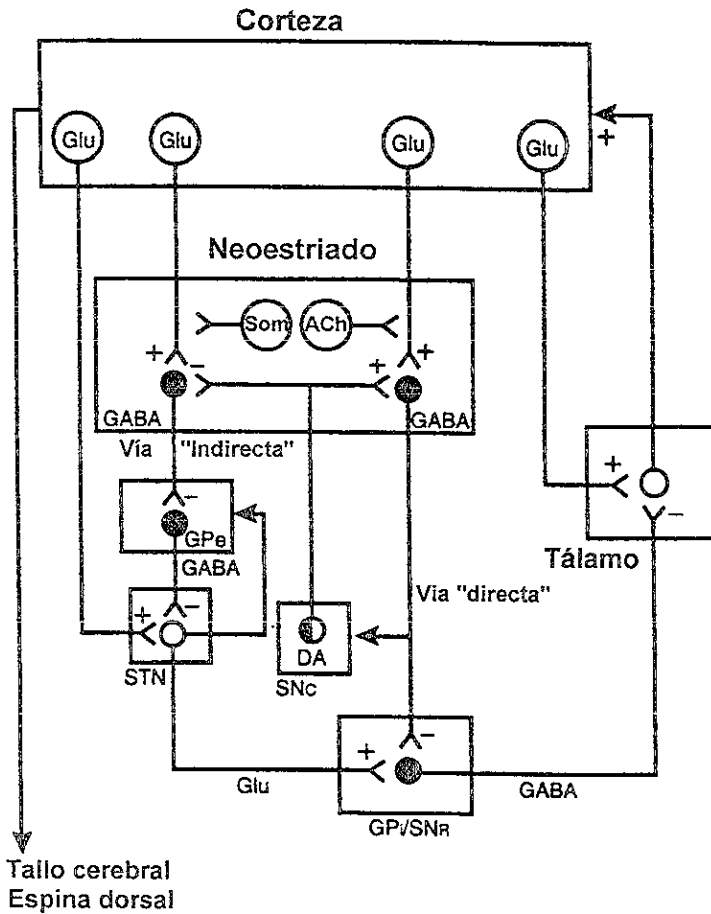


Figura 2.- Las diferentes conexiones realizadas entre los componentes neuronales de los ganglios basales originan las llamadas vías "directa é "indirecta" (Modificado de Suskiw, 1992). STN: Núcleo subtalámico. SNC: Substancia nigra compacta. GPi/SNr: Globo pálido interno/Substancia nigra pars reticulada. Glu: Nueuras glutamatérgicas SOM: Neuronas somatostatinérgicas. Ach: Neuronas colinérgicas.

Elementos neuronales del neocóstriado

El neocóstriado es el componente más grande y receptivo de los ganglios basales, de allí su importancia relativa en el estudio del mismo.

El neocóstriado está compuesto de un gran número de neuronas con un diámetro cercano a los 15 μm (neuronas espinosas), un pequeño número de interneuronas no espinosas y fibras aferentes. Pese a que las interneuronas son la población más pequeña, ésta población representa una fuente rica en variedad y complejidad funcional. (Graybiel, 1994; Parent, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1995; Rushlow, 1994, 1996; Wilson, 1998)

La neurona espinosa mediana

Este tipo neuronal fue descrito por Cajal como cruciforme axodendrítica (Fox *et al.*, 1971 en Shepard, 1998). La neurona espinosa mediana de proyección estriatal representa más del 90% de la población total presente en este núcleo. Presentan un amplio número de espinas dendríticas cubriendo a las dendritas de las mismas. La mayor importancia de este tipo de arborización neuronal es que las fibras individuales cruzan los campos dendríticos de muchas neuronas. El cuerpo de estas células está dentro del rango de 12-15 μm y originan un pequeño número de troncos dendríticos (4 a 5). Tanto los somas celulares como los troncos dendríticos se encuentran libres de espinas.

Dichos troncos dendríticos comienzan a dividirse a los 25-35 μm de distancia de su origen para convertirse en dendritas espinosas secundarias que entonces pueden ramificarse una o dos veces más. Las arborizaciones dendríticas terminales presentes en una neurona espinosa mediana pueden llegar a ser hasta 30, que se expanden alrededor de toda la neurona y alcanzan un diámetro de hasta 0.5 mm (500 μm). La densidad de las espinas dendríticas se incrementa después de la aparición de la primera y aumenta conforme se aleja del soma. La máxima densidad que se tiene reportada es de 4-6 espinas por 1 μm de longitud dendrítica, convirtiendo a la neurona estriatal mediana en una de las más cargadas de espinas de todo el cerebro. El diámetro de estas dendritas va disminuyendo con la longitud de la misma, comienza alrededor de 1.5 μm y termina midiendo no más de 0.25 μm en las puntas, de igual manera decae el número de espinas (Wilson, *et al.*, 1983).

A partir de una región bien definida del cuerpo celular o de un tronco dendrítico se origina el axón de las neuronas espinosas medianas. El axón principal emite notorias colaterales antes de alejarse del soma celular, a su vez, estas colaterales originan una nueva serie de arborizaciones axonales.

Existe una clasificación para las neuronas espinosas medianas a partir del tipo del objetivo que alcanzan sus axones. Aproximadamente la mitad de éstas caen en la clase de neuronas que origina la vía indirecta, que proyecta solamente al segmento externo del globo pálido (ver introducción), mientras que las restantes forman la vía directa, las cuales presentan axones altamente colaterizados y proyectan a una serie de objetivos estriatales distintos: los segmentos tanto interno como externo del globo pálido y la sustancia nigra reticulada.

Interneuronas.

Se han determinado cuatro grandes tipos de estas poblaciones usando conjuntamente técnicas fisiológicas, citoquímicas y morfológicas. A la fecha han sido divididas en (1) interneuronas colinérgicas gigantes las cuales son detectables por la presencia de colina acetil-transferasa (ChAT); (2) Interneuronas GABAérgicas que contienen parvalbúmina, una de las proteínas de unión al calcio; (3) Interneuronas GABAérgicas que contienen calretinina; y (4) una clase de interneuronas que contienen somatostatina, NADPH-diaforasa y óxido-nítrico sintetasa (NOS), y que posiblemente también sintetizan GABA (Kawaguchi *et al.*, 1990, 1993; Wilson, 1998).

Interneuronas Colinérgicas

De todas las interneuronas estudiadas en el neostriado, las colinérgicas son las mejor conocidas y no representan más del 3% de la población neuronal total. Son la fuente más importante de acetilcolina y colina acetil-transferasa (ChAT) en el neostriado. En adición a sus largos somas, sus arboles dendríticos están ampliamente distribuidos, abarcando una región mayor a la de una neurona espinosa mediana (Wilson *et al.*, 1990). Este tipo celular es capaz de integrar las entradas sinápticas en regiones mayores. Sus campos axonales son muy extensos comparados con los de las neuronas comunes estriatales de proyección. Estas características originan la posibilidad de que la interneurona colinérgica funcione como una neurona de integración.

Interneuronas GABAérgicas

Estas interneuronas tiene una alta capacidad de recaptura de GABA exógeno. El descubrimiento de la presencia de la proteína de unión a calcio Parvalbúmina, permitió diferenciarla de la población mayor del neostriado (Gerfen *et al.*, 1987). No representan más del 2% de la población neuronal total.

Otro grupo de interneuronas GABAérgicas contienen la proteína de unión a calcio Calretinina (Kawaguchi, 1995; Bennett y Bolam, 1993). Al igual que la parvalbúmina, la calretinina funciona

como un amortiguador de calcio. Estas células tienen la capacidad de disparar potenciales de acción a muy altas frecuencias, en forma de ráfagas (Flores-Hernández *et al.*, 1994).

Interneurona Somatostatinérgica/NOS

Las interneuronas que contienen somatostatina son células no espinosas con un diámetro que va de 12-25 μm y representan del 1-2% de la población total. En comparación con las células colinérgicas y positivas a parvalbúmina, éstas presentan menos ramificaciones dendríticas. Su arborización axonal es menos densa en la región del campo dendrítico, que es más extenso y relativamente carente de ramificaciones en regiones amplias del neocórtex. En estas células se han identificado más neurotransmisores y cotransmisores que en cualquier otra célula del córtex. Al igual que las neuronas medianas, las interneuronas somatostatinérgicas presentan largos axones. Este grupo de células puede liberar somatostatina, óxido nítrico, neuropéptido-Y y posiblemente GABA, el cual se piensa puede ser liberado dependiendo del patrón de disparo que se presente (Chesselet *et al.*, 1986; Figueredo-Cardenas *et al.*, 1996)

Estas interneuronas se reconocieron primeramente con la reacción histoquímica para NADPH-diaforasa. Los somas de estas neuronas no tiñen fuerte para GAD o para el GABA, sus terminales axónicas contienen GABA, y probablemente también sean interneuronas GABAérgicas (Kawaguchi *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que las interneuronas somatostatinérgicas reciben entradas corticales directas (Vuillet *et al.*, 1992; Kawaguchi *et al.*, 1995), las cuales podrían ser glutamatérgicas (Garside y Masurek, 1997). De igual manera se ha demostrado que reciben innervación colinérgica y dopaminérgica estriatal, y también expresan el receptor NK-1 de Substancia P.

Entre las funciones más importantes del óxido nítrico conocidas a la fecha, se incluyen la vasodilatación (probablemente este tipo de neuronas controlen el flujo de sangre en el neocórtex en respuesta a las entradas palidales y corticales) y la acción del óxido nítrico como transmisor que influencia la liberación de otros transmisores, al igual que una modulación directa de ciertos canales (Manzoni *et al.*, 1992 en Kawaguchi, 1995).

Los largos axones de las interneuronas somatostatinérgicas pueden llegar a extenderse hasta 1 mm del cuerpo celular, tal situación sugiere que estas células pueden influenciar la transmisión y el flujo sanguíneo en un espacio mayor que cualquier otra neurona estriatal.

Las terminales de las neuronas somatostatinérgicas hacen sinapsis por toda la periferia dendrítica del neocóstriado que incluye a las neuronas medianas de proyección, y se piensa que la acción de estas células contribuye al mantenimiento y especialización del circuito local del estriado.

En la figura 3, se muestra la reconstrucción de los diferentes elementos neuronales del neocóstriado. En 3-A se encuentra la reconstrucción de una neurona mediana de proyección. Nótese el alto número de espinas dendríticas de dichas células y el tamaño de las mismas. En 3-B se encuentra una reconstrucción de una interneurona inmunoreactiva a parvalbúmina. 3-C representa una interneurona inmunoreactiva para NDPH diaforasa y que libera NO, mientras que en 3-D una interneurona inmunoreactiva a colina acetiltransferasa ChAT; interneuronas GABAérgicas, Somatostatinérgicas y Colinérgicas, respectivamente.

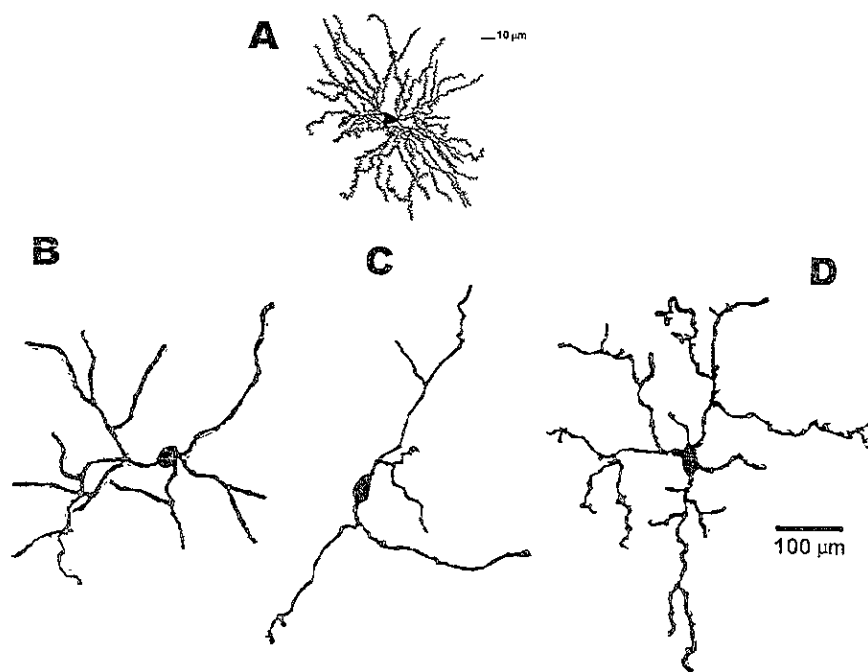


Figura 3 - Los diferentes tipos morfológicos de neuronas presentes en el Neocóstriado. A) Neurona espinosa mediana de proyección; B) Interneurona inmunoreactiva a Parvalbúmina (Interneurona GABAérgica); C) Interneurona inmunoreactiva a NADPH-D (Interneurona Somatostatinérgica); D) Interneurona inmunoreactiva a Colina Acetiltransferasa (Interneurona Colinérgica). Note la diferencia en la calibración para A con respecto a B, C, y D (Modificado de Kawaguchi; 1995)

La Somatostatina en el Sistema Nervioso Central

A finales de los años 60's un grupo de investigadores identificó un factor que reducía de manera importante la liberación de hormona de crecimiento en cultivos de células hipofisarias (Krulich *et al.*, 1968). Posteriormente, Brezau y colaboradores (1972) identificaron a partir de preparaciones de hipotálamo bovino, un péptido que inhibía la secreción de la hormona de crecimiento de la hipófisis. La actividad inhibitoria de este péptido resultó ser dependiente de la concentración y atribuible a un "factor inhibitorio de la liberación de somatotropina" o SRIF (por sus siglas en inglés). La secuencia de aminoácidos determinada para este factor desconocido hasta entonces mostró un tetradecapéptido cíclico con un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína 3 y 14. Brezau y colaboradores propusieron el nombre de "somatostatina" para enfatizar su papel como una contraparte de la "somatotropina" u hormona de crecimiento (Gillies, 1997).

Una serie de estudios posteriores demostraron la existencia de diversas formas de somatostatina en mamíferos, entre las cuales se descubrieron, la somatostatina-28 (SOM-28) y somatostatina-25 (SOM-25), que difieren de la somatostatina-14 (SOM-14) por el número de aminoácidos que las constituyen. A partir de la comparación de secuencias entre la SOM-28 y la SOM-14 se estableció que la secuencia de aminoácidos de esta última estaba contenida en la SOM-28, además de una extensión de 11 a 14 aminoácidos, dependiendo del péptido precursor (SOM-25 o SOM-28 respectivamente) (Pradayrol *et al.*, 1980; Esch *et al.*, 1980); resulta muy interesante el descubrimiento de que la SOM-28 tiene diversas acciones fisiológicas, mientras que la SOM-25 es un péptido sin actividad biológica conocida hasta la fecha. Se ha demostrado que la somatostatina-28 es más que un precursor de SOM-14; diversos estudios han confirmado que la acción de ésta es fisiológicamente distinta al de la SOM-14, mostrando en ciertas células mayor eficiencia y potencia en su acción. De hecho, se ha postulado que la SOM-28 es la isoforma que se libera del hipotálamo al torrente sanguíneo para llegar a la hipófisis; y probablemente esta forma larga de somatostatina sobreviva más tiempo en el plasma que la forma corta SOM-14.

La determinación de la secuencia de la prohormona de la somatostatina (Goodman *et al.*, 1983), permitió determinar que el ARNm de la somatostatina es transcrito como parte de una molécula precursora muy grande denominada pre-prosomatostatina (Figura 4). EL ADNc de la pre-prosomatostatina contiene un marco de lectura que codifica para un polipéptido de 116 aminoácidos. La pre-prohormona se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso y es liberada en el lumen del

retículo endoplásmico, donde entonces es cortada por proteasas específicas. La prohormona restante es transportada al aparato de Golgi; ahí comienza el proceso de empaquetamiento en vesículas secretorias. Cuando se realiza el almacenamiento pueden tener lugar una serie de modificaciones post-traduccionales. La división de la prohormona en somatostatina-14 y somatostatina-28 requiere de la actividad de enzimas endoproteolíticas propéptido (PC). En total han sido determinadas seis de esas enzimas (Seidah *et al.*, 1990; 1993; Patel *et al.*, 1997). La conversión toma lugar en los residuos mono ó dibásicos, aunque otras características estructurales se requieren para la acción coordinada de esas endoproteasas (Brakch *et al.*, 1993; Seidah *et al.*, 1993).

La conversión en somatostatina a partir del propéptido depende directamente del tipo celular donde se realice. En neuronas y tejido pancreático, el producto principal es SOM-14, la cual se genera por la acción endoproteolítica de la enzima PC2 y PC1 (Brakch *et al.*, 1995), mientras que en extractos intestinales y en el hipotálamo (Pradayrol *et al.*, 1980; Esch *et al.*, 1980) la síntesis de la prohormona origina SOM-28.

En adición al papel endocrinológico atribuido a la somatostatina, se encuentra su acción como neuromodulador y/o neurotransmisor. Los primeros reportes que indicaron la presencia de la somatostatina en sitios extrahipotalámicos del cerebro, aparecieron en la década de los 70's (Vale *et al.* 1977; Brownstein, 1975), pues se demostró la presencia de somatostatina en sinaptosomas y se reportó que actúa como transmisor excitatorio en el hipocampo (Dodd y Kelly, 1978).

El efecto modulador de la somatostatina no fue genérico, algunos autores reportaron originalmente una acción inhibitoria de la somatostatina (Renaud *et al.*, 1975) mientras que otros reportaron efectos excitatorios. (Dodd y Kelly, 1978; Schindler *et al.*, 1996).

En diversos estudios se reportó que la somatostatina reduce los niveles de AMPc, en otros casos la acción de este péptido se encuentra mediada por la liberación de ácido araquidónico (Schweitzer *et al.*, 1998; Tentler y Hadcock, 1997).

La interacción del péptido en el medio intracelular bloquea la acción de la adenilato ciclasa (Kleuss *et al.*, 1991; Raynor *et al.*, 1992; Tallent *et al.*, 1996; Rodríguez-Sánchez y Siggins, 1997) y recientemente se demostró que la SOM estimula la actividad de la tirosin fosfatasa para inhibir el crecimiento celular.

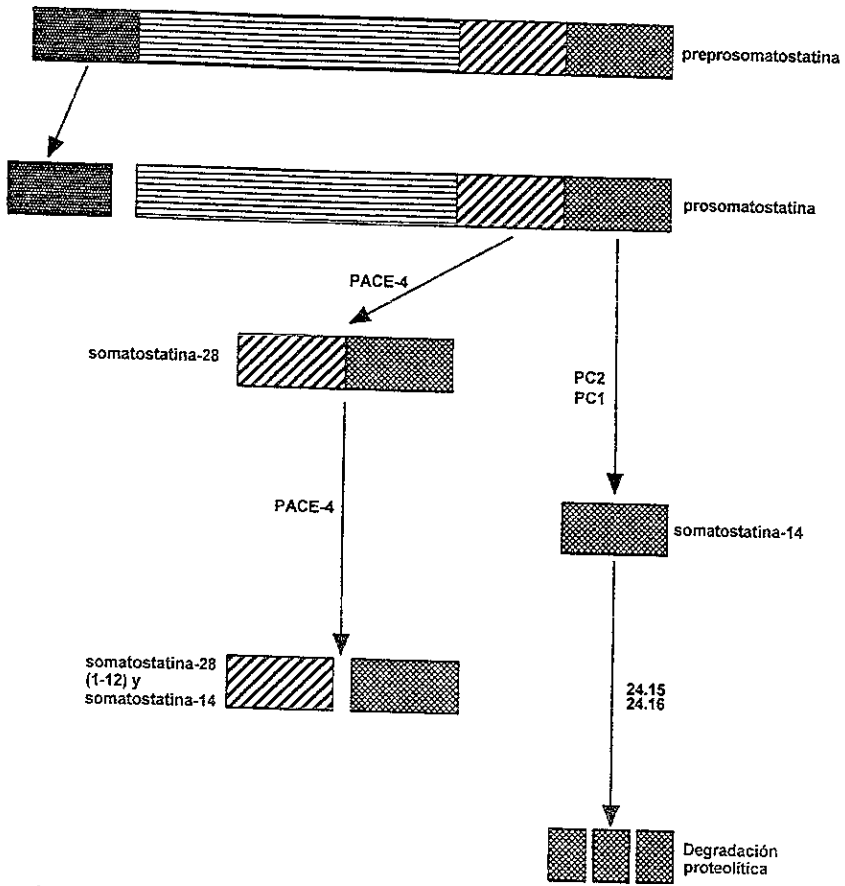


Figura 4.- La síntesis del péptido se encuentra mediada por una serie de enzimas proteolíticas que participan directamente en la generación de las diferentes formas activas de la SOM: SOM-14 y SOM-28 (Modificado de Schindler; 1996)

Con el advenimiento de las técnicas de registro electrofisiológico, como la fijación de voltaje, se pudo esclarecer aún más, las acciones modulatorias de la misma. Twery y Gallagher (1989) demostraron que la somatostatina produce hiperpolarizaciones membranales, al igual que una disminución de la resistencia de entrada de las neuronas del núcleo dorsolateral septal en ratas. Inoue y cols. (1988), demostraron que la responsable de esta hiperpolarización era una corriente producida por un rectificador entrante de potasio ($I_{K(er)}$) modulado por somatostatina-14, esto en neuronas del *locus coeruleus*. El efecto producido por la somatostatina sobre el rectificador entrante es sensible a toxina pertusis (PTX) (Boehm y Betz, 1997; Kreienkamp *et al.*, 1997), lo que sugiere, una modulación por proteínas G tipo G_i o G_o (Rens-Domiano y Reisine, 1991;). Sin embargo, también se ha reportado modulación por somatostatina insensible a PTX (Twery y Gallagher., 1991).

En el hipocampo, la SOM-14 actúa como un co-transmisor incluido en las interneuronas GABAérgicas (Freund y Buzsaki, 1996, en Bohem, 1997). Tales neuronas liberan somatostatina de una manera dependiente de Ca^{2+} (Mathe *et al.*, 1993; Fontana *et al.*, 1996); sin embargo, sigue sin estar claro si este neuromodulador actúa inhibitoriamente como el GABA o de manera excitatoria. Los efectos inhibitorios han sido demostrados en hipocampo de rata (Pittman y Siggins, 1981), pero la acción excitatoria ha sido demostrada en la misma preparación (Dodd y Kelly, 1978).

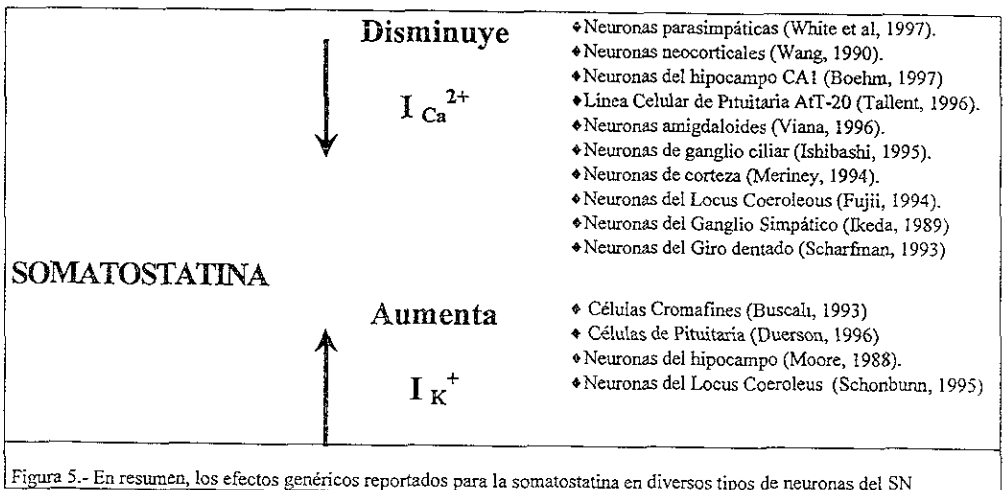
La inhibición de las corrientes de Ca^{2+} por somatostatina es un efecto visto constantemente en diferentes células del sistema nervioso central. Los efectos modulatorios de las corrientes de Ca^{2+} incluyen la inhibición de corrientes de alto voltaje de activación (HVA), no así de corrientes de bajo umbral tipo LVA. El efecto ha sido reportado tanto para SOM-14 como para SOM-28. Dicho efecto es selectivo para cada péptido, por lo menos en neuronas corticales de rata; de igual manera, se presenta un retardo en la fase emergente de las corrientes de Ca^{2+} activadas a altos voltajes; el efecto de la somatostatina en todos los casos es concentración-dependiente y reversible; hasta la fecha no se tienen reportados efectos aditivos en la inhibición de corrientes de Ca^{2+} (Wang *et al.*, 1990).

Bohem y Betz (1997) demostraron una inhibición de la transmisión sináptica mediada por SOM-14 en hipocampo de rata. Otros trabajos reportan el acople de distintos receptores de somatostatina con una corriente de Ca^{2+} tipo L en una línea celular de hipófisis (Tallent, 1996); Viana y Hille (1996) demostraron la modulación de la SOM sobre canales de calcio activados por alto voltaje en neuronas de la amígdala de rata.

El efecto inhibitorio de la somatostatina sobre las corrientes de Ca^{2+} en neuronas del ganglio ciliar está mediado por una Proteína Cinasa dependiente de GMPc, mientras que en la línea celular GH3 de pituitaria la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} son independientes de la concentración de AMPc; en tales estudios, la corriente de Ca^{2+} sensible a somatostatina es del tipo L (Lewis *et al.*, 1986;

Tallent *et al.*, 1996). Tales resultados han dado lugar a que se postule que la acción de la somatostatina sea a través de por lo menos dos vías distintas de señalización iniciadas por sus receptores: una vía que inhibe las corrientes de Ca^{2+} a través de un mecanismo delimitado por la membrana, y un segundo mecanismo en el que se establece la inhibición a través de una Proteína Cinasa dependiente de GMPc; En la figura 6 se muestran las diferentes vías de señalización propuestas para la somatostatina.

La razón de las discrepancias en la acción moduladora de la somatostatina y los efectos fisiológicos producidos por la misma, pueden deberse a diversas razones; y es que (1) la somatostatina actúa a través de por lo menos cinco diferentes receptores (Bell y Reisine, 1993; Hoyer *et al.*, 1995; Reisine, 1995), y los diferentes receptores pueden estar mediando una acción moduladora opuesta incluso, en una misma célula. (2) los efectos contrastantes de la somatostatina pueden ser resultado de una acción indirecta o directa. Tales acciones pueden estar mediadas por acetilcolina (Araujo *et al.*, 1990; Inoue y Yoshi, 1992) o dopamina (Chesselet y Reisine, 1983; Thermos *et al.*, 1996; Hathway *et al.*, 1998), la liberación de estos transmisores puede estar mediada por este neuropéptido. (3) los efectos opuestos pueden surgir cuando un neurotransmisor activa a los receptores pre ó postsinápticos respectivamente. Los receptores presinápticos para la somatostatina han sido descritos en neuronas simpáticas y parasimpáticas (Bohem y Huck, 1996; Gray *et al.*, 1989, en Bohem, 1997) y en neuronas del área CA1 y del Giro Dentado del hipocampo de la rata y el conejo (Scharfman, 1993).



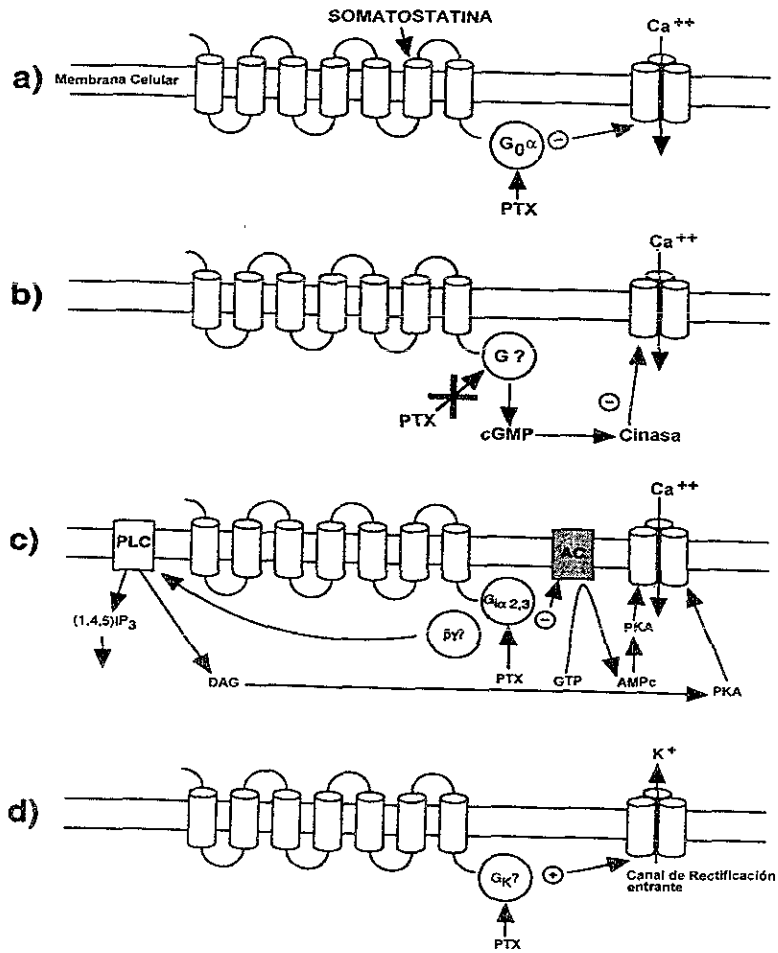


Figura 6.- Los diferentes mecanismos propuestos para la acción moduladora de la SOM. A) El péptido actúa a través de una proteína G sensible a toxina pertusis que modula negativamente un canal de Ca^{2+} . B) La modulación es a través de una cinasa dependiente de GMPC e insensible a toxina pertusis. D) La inhibición del canal de Ca^{2+} es a través de la inhibición de la Adenilato Ciclasa y sensible a toxina pertusis. D) La activación de un canal de rectificación entrante es mediante un canal GIRK sensible, de nueva cuenta a PTX.

Receptores de Somatostatina.

A pesar de las observaciones de Brezau y colaboradores, las mayores concentraciones de SOM se encuentran fuera del hipotálamo (Holloway *et al.*, 1996; Piwko y Hoyer, 1996). Una serie de estudios farmacológicos permitió reconocer que los receptores de somatostatina se expresan diferencialmente con propiedades únicas en la selectividad de los péptidos, distribución regional, y funciones (Bell y Reisine, 1993).

Las regiones más ricas en somatostatina del cerebro se encuentran en neuronas de la amígdala, neocorteza, hipocampo, corteza cerebral, área periventricular y en los ganglios basales (Martin *et al.*, 1991). En estos últimos, la mayor concentración de somatostatina se encuentra en el neostriado (Johansson *et al.*, 1984).

La SOM ejerce su efecto fisiológico a través de su unión a receptores de membrana. Los receptores de SOM, son proteínas embebidas en la membrana celular con siete dominios transmembranales que interactúan en su dominio citoplasmático con proteínas G. Una serie de estudios (Reisine, 1995; Kreienkamp *et al.*, 1997) demostraron que estos receptores se asocian con las subunidades $G\alpha_{i-1}$, $G\alpha_{i-3}$, $G\alpha_o$, la subunidad β_{36} y la subunidad δ_3 . Tallent (1995), y Puebla y cols., (1996) mencionan que la $G\alpha_{i-1}$ acopla a los receptores de somatostatina con la adenilato ciclasa, y que la $G\alpha_{i-3}$ puede asociar a estos receptores con canales de K^+ . De igual manera Kleus y cols. (1991, 1992) reportaron que la subunidad $G\alpha_o$ se acopla con distintos canales de Ca^{2+}

Los dos primeros receptores de SOM clonados fueron referidos como SSTR1 y SSTR2 respectivamente. La similitud en la secuencia de sus aminoácidos es de alrededor del 45%, con una alta similitud en sus regiones transmembranales.

Yasuda *et al* (1992) llevaron a cabo la clonación de un tercer receptor SSTR3. Al igual que el receptor SSTR2, este receptor es sensible a la acción de la toxina pertusis, lo que sugiere acoplamiento con proteínas-G del tipo G_i/G_o (Kumatsuzaki *et al.*, 1997).

Posteriormente Bruno (1992) clonó el receptor SSTR4 y O'Carroll (1992) realizó la clonación del receptor SSTR5; siendo este último el único capaz de presentar alta afinidad tanto por la SOM-14 como la SOM-28, a diferencia de los otros cuatro receptores, los cuales presentan alta afinidad solo por la SOM-14.

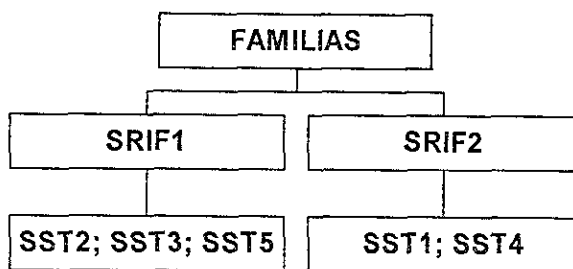
Aunque los cinco receptores de somatostatina presentan similitud en la secuencia de AA (45 - 55%), los receptores SSTR1 y SSTR4 tienen una similitud en secuencias superior a la que

presentan los demás. De igual manera, los receptores SSTR2 y SSTR5 muestran homología tanto en la secuencia de aminoácidos como en respuesta funcional.

Hoyer y colaboradores. (1995) propusieron una clasificación que incluye dos familias de receptores de somatostatina. Dicho clasificación está representada en la figura 7.

La familia SRIF1 incluye a los receptores SSTR2, SSTR3 y SSTR5, mientras que la familia SRIF2 incluye a los receptores SSTR1 y SSTR4.

CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA



Bell y Reisine. 1993

Reisine, T. 1995

Hoyer *et al.*, 1995

Kumar *et al.*, 1997

Figura 7.- Clasificación de las diferentes familias de receptores de Somatostatina.

Los receptores SSTR1 y SSTR4 se unen con más afinidad a la SOM-28; sin embargo, no existen todavía ligandos específicos para determinar de manera diferencial la acción de ambos receptores. Los análogos de somatostatina Octreótido y Seglftido se unen con mucha afinidad al receptor SSTR2; de hecho, este receptor es el único que cuenta con ligandos selectivos (Reisine, 1995; 1998 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement. pp 70-71). De igual manera el péptido lineal BIM-23052 ha sido reportado con alta afinidad para el receptor SSTR5. Hasta el momento, no ha sido caracterizado un análogo altamente selectivo al receptor SSTR3.

En diversas preparaciones se ha demostrado, tanto bioquímica como morfológicamente, que diversos ligandos interactúan con receptores acoplados a proteínas G (Gudermann *et al.*, 1997) y

rápidamente se internalizan a sus células blanco después de unirse al receptor en la superficie celular. Este proceso, conocido como internalización mediada por el receptor, es posible que involucra grupos locales de receptores seguidos por un mecanismo de *endocitosis a través de cubiertas de clatrina* (Goldsten y Brown. 1985 en Nouel y Beaudet. 1997).

La internalización del ligando y/o el receptor ha sido descrita para una variedad de neuropéptidos incluida Substancia-P, Angiotensina II y Vasopresina, entre otros (Nouel y Beaudet. 1997).

Al igual que muchos receptores acoplados a proteínas-G, los receptores de somatostatina se desensibilizan después de tratamientos prolongados al agonista. A excepción del receptor SSTR4, en todos los receptores de SOM se ha reportado que sufren desensibilización después de tratamientos prolongados al agonista, sin embargo, el receptor SSTR1 presenta mayor resistencia a la desensibilización (Reisine, 1995; Roth *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito la internalización diferencial de los distintos receptores de SOM. Dicha internalización depende directamente del estado del receptor y en muchos casos la internalización es debida a la liberación de somatostatina endógena (Dournaud, P. y cols 1998).

Si los receptores de SOM internalizan de una manera comparable después de la interacción con el ligando es materia de debate. Distintos reportes indican que la internalización de la SOM se presenta en células pancreáticas, hipofisarias y líneas celulares después de la aplicación exógena de ligandos específicos. Sin embargo, otros reportes indican que la SOM no internaliza en ciertas líneas celulares (Schonbrunn, 1986). Una interpretación para explicar las discrepancias reportadas en la bibliografía fue dada por Nouel *et al.*, (1997) y es que puede haber una capacidad diferencial de los varios subtipos de *receptores de SOM para internalizar al péptido*, esto dependiendo de la expresión en cada tipo de tejido.

Disparo Neuronal

Como una característica morfológica exclusiva de una especie biológica, existen diferentes tipos de disparo neuronal ó patrones temporales de potenciales de acción que corresponden a cada tipo de neurona conocida del sistema nervioso central. El estudio de los mismos, de los diferentes canales iónicos que los determinan, las diferentes fases que participantes en el mismo, su generación y propagación, así como su modulación, son las tareas básicas de la neurofisiología (Bargas *et al*, 1993).

Cuantitativamente, el potencial de acción fue descrito por Hodgkin y Huxley, en el axón gigante del calamar en 1952 utilizando la técnica de fijación de voltaje. El descubrimiento de este fenómeno

permitió por primera vez determinar las diferentes corrientes que participaban en el mismo. En la actualidad es sabido que la rápida señalización en el sistema nervioso central está acompañada por descargas eléctricas de corta duración que se propagan a través de la membrana celular (potencial de acción, PA). El descubrimiento de este fenómeno permitió establecer las bases modernas de la biofísica.

En las neuronas de los animales superiores, durante la generación del potencial de acción se involucran diversas conductancias iónicas además de la entrante de sodio (I_{Na^+}) y la corriente saliente de potasio (I_K) como la de inactivación de los canales de sodio, responsable de la repolarización del PA.

A diferencia de lo que sucede en el axón del calamar, en las neuronas de los animales superiores, existe gran diversidad de canales iónicos tanto en el soma como las dendritas que originan, a su vez, mayor complejidad de integración en la señalización eléctrica. Pese a que el disparo neuronal es un evento "todo ó nada", y en términos generales su iniciación y las diferentes corrientes iónicas que participan son iguales, difieren de manera considerable en su patrón de disparo funcional. Por ejemplo algunas neuronas disparan espontáneamente, mientras que otras no lo hacen. Algunas son capaces de presentar el fenómeno de adaptación en su disparo, mientras que otras están incapacitadas para esta función; ciertas neuronas disparan en ráfagas de alta frecuencia y durante breves periodos de tiempo, mientras otras son capaces de generar un disparo continuo, tónico. Finalmente, ciertas neuronas poseen propiedades biestables ó disparo de larga latencia, etc. (Bargas *et al.*, 1993).

La fase rápida de ascendente en un PA es un evento mediado por una corriente transitoria de sodio regenerativa denotada I_{Na^+} . Tal corriente es activada por despolarización de la membrana y representa por sí misma una influencia despolarizante para la célula entera. Cuando se inicia esta fase en la membrana celular se ocasiona un incremento en la apertura de canales de Na^+ , por consiguiente una entrada mayor de iones de Na^+ al interior de la célula. La corriente I_{Na^+} presenta sensibilidad al voltaje y su activación también es voltaje-dependiente. La despolarización producida por la entrada masiva de iones Na^+ al interior de la célula en un "parche" de membrana propaga dicha despolarización a las zonas adyacentes a la primer región despolarizada. Tales mecanismos propician la propagación del PA a lo largo de un axón.

La repolarización de un PA se basa en dos procesos en la mayoría de las neuronas: la inactivación rápida de la I_{Na^+} transitoria y la activación de corrientes de K^+ . Incluso durante la fase emergente del PA la disposición de canales de Na^+ se ve disminuida debido a su inactivación. Al mismo tiempo que se genera la fase de inactivación de la I_{Na^+} comienza una fase de activación de corrientes de K^+ , denominada I_{K^+} que emerge asociada al potencial de acción, esta permite a los iones

K^+ salir de la célula. En cierto punto la influencia hiperpolarizante de los iones K^+ es mayor a la despolarizante mediada por Na^+ , dando fin al potencial de acción y generando una repolarización de la membrana.

El detonador del PA se presenta cuando la membrana está lo suficientemente despolarizada para alcanzar el umbral de disparo; dicho umbral es el potencial de membrana al cual la activación de las corrientes despolarizantes (I_{Na^+}) es suficientemente fuerte para superar la inactivación de dichas corrientes al igual que iniciar la activación de las corrientes hiperpolarizantes de la neurona para regresarla posteriormente a su estado de reposo. Al umbral, la generación de un PA en un evento todo-o-nada; de superarse el mismo se genera un PA y la información es transferida al axón para causar la liberación de neurotransmisores en la sinapsis. Si el evento despolarizante no alcanza al umbral de disparo no se genera un PA y dicho evento no tiene consecuencias en otras células

La duración del PA y el patrón temporal de disparo son consecuencia de los diversos canales iónicos presentes en las membranas celulares, los cuales generan corrientes transitorias ó persistentes. Los neurotransmisores, el influjo de calcio ó el postpotencial hiperpolarizante, modulan la frecuencia y el patrón de disparo neuronal. De manera paralela, diversas señales químicas modulan el funcionamiento de grupos de neuronas en el sistema nervioso central. La respuesta celular generada por un potencial de acción puede ser modulada por mecanismos intracelulares como lo son, la activación de segundos mensajeros ó proteínas G. Dicha modulación de canales iónicos altera propiedades como las constantes espaciales dendríticas, la duración del postpotencial hiperpolarizante de los somas y el contenido cuántico de liberación de las terminales nerviosas, cambiando de manera definitiva los campos receptivos y las respuestas neuronales.

Postpotencial hiperpolarizante

Los potenciales de acción están seguidos por una repolarización llamada postpotencial hiperpolarizante (PPH). Dicho evento tiene dos funciones principales: limitar y establecer la frecuencia de disparo de potenciales de acción y generar el fenómeno de adaptación de la frecuencia de las espigas.

Es sabido que la entrada de Ca^{2+} a la célula activa por lo menos dos tipos de corrientes de K^+ , las cuales participan directamente en la generación y duración del PPH. Estas fases dependientes de Ca^{2+} involucran diferentes canales de potasio.

La fase rápida del PPH se caracteriza por la participación directa de canales de alta conductancia de potasio denominados BK. Cuando estos canales se activan se genera la repolarización

inmediata de la membrana después del PA; seguida a esta fase, se presenta una más prolongada que puede durar varios cientos de milisegundos en la cual se activan canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} denominados SK. Estos canales presentan mayor sensibilidad al Ca^{2+} que los BK, y son los encargados de generar la fase lenta del PPH.

La corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} SK que genera el postpotencial hiperpolarizante lento (PPH_L) es bloqueada por apamina y es denominada I_{AHP} . Esta corriente es menos sensible al voltaje, decae exponencialmente y no es inhibida por TEA. Estos canales son de baja conductancia (5-20 pS). En diversas neuronas se considera que la activación de los canales SK_{Ca} subyace al postpotencial hiperpolarizante que sigue al influjo de Ca^{2+} durante el potencial de acción.

La otra corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} (BK), que genera el postpotencial hiperpolarizante rápido (PPH_R), es más sensible al voltaje y se bloquea con bajas concentraciones de TEA. Los canales BK presentan alta conductancia (>100 pS). Algunos de estos canales también presentan sensibilidad a Caribdotoxina (CTX). La corriente macroscópica generada por estos canales es denominada I_C . La activación de esta corriente contribuye a la repolarización del potencial de acción y la fase rápida del PPH. Dichos canales también participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante. Duerson y cols., (1996) demostraron que los canales BK también son modulados por somatostatina en una línea celular de pituitaria.

Además de estas corrientes, se encuentran las transitorias de K^+ . Estas han sido llamadas de inactivación rápida, y participan directamente en la latencia del disparo neuronal, mantiene una frecuencia de disparo y regulan la estabilización del potencial de membrana. Se denomina I_A y es sensible a la 4-AP.

En resumen, los canales más importantes involucrados en el postpotencial hiperpolarizante son los BK_{Ca} y SK_{Ca} ; ambos participan en la generación del PPH de las neuronas neocorticales (Pineda et al, 1992).

El papel del Ca^{2+} en el disparo neuronal

La entrada de Ca^{2+} en las neuronas a través de canales voltaje-dependientes es de amplia importancia e interés funcional. Las corrientes transmembranales acarreadas por iones de Ca^{2+} influyen la generación de espigas y patrones de descarga alterando directamente el potencial transmembranal y promoviendo indirectamente la apertura de canales dependientes de Ca^{2+} . La activación de canales voltaje-dependientes por la elevación del calcio citosólico produce una amplia serie de respuestas en enzimas de señalización intracelular, incluidas aquellas involucradas en la liberación de neurotransmisores, sensibilidad de receptores y expresión genómica (Murphy et al., 1991; Berridge, 1993; Bargas et al., 1994)

Galarraga y cols. (1989) demostraron la importancia de la entrada del calcio en la generación del patrón temporal y frecuencia de disparo en neuronas de proyección del neocórtex de la rata. El bloqueo de la entrada de Ca^{2+} produce un incremento de la frecuencia de disparo y disminución de la frecuencia de adaptación. Este fenómeno está acompañado de una disminución del postpotencial hiperpolarizante. La $\text{gK}_{(\text{Ca})}$ responsable de la fase lenta del PPH está involucrada en la generación del patrón de disparo neuronal. Dicha gK participa directamente en la duración del intervalo interespigas de los PA's, frecuencia baja de disparo y adaptación. Posteriormente, Pineda et al. (1992) confirmaron los datos obtenidos acerca de la dependencia de Ca^{2+} en el mantenimiento de PPH y el patrón temporal de disparo. La figura 8 muestra el experimento realizado por Pineda (1992). El aumento en la frecuencia de disparo se ve incrementado aún más en presencia del bloqueador de canales de Ca^{2+} , Cd^{2+} .

Las variaciones en el patrón de disparo, generadas por los distintos neurotransmisores y moduladores son reguladas por la entrada de calcio. En las neuronas de proyección del estriado la entrada de Ca^{2+} puede activar hasta cuatro tipos diferentes de canales de calcio incluidos los de tipo N, L P y Q (Bargas et al., 1994).

Diversos estudios han demostrado que el PA de neuronas del estriado tiene un componente acarreado por iones de calcio. Dicho influjo parcialmente dispara la activación de un postpotencial que sigue a un potencial de acción. La importancia del PPH es que funciona como un regulador de frecuencia y duración del potencial de membrana durante disparos repetitivos. El postpotencial hiperpolarizante es un blanco de acción de los neuromoduladores (Brown, 1990; Pineda et al., 1995; Hernández-López et al., 1996), y su regulación provee una variedad de vías para establecer los niveles de excitabilidad de las neuronas y sus redes (Pineda et al., 1995).

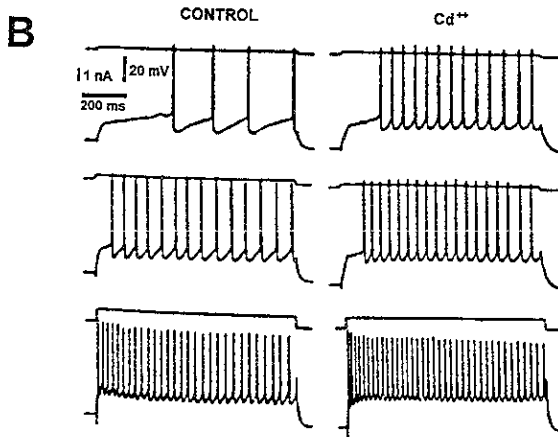
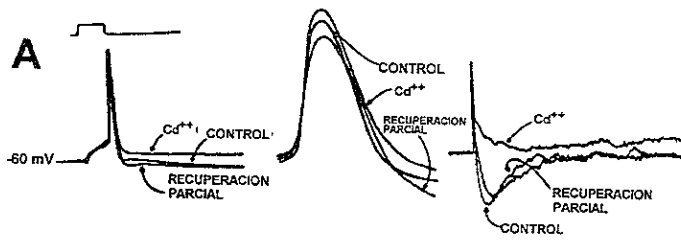


Figura 8.- El disparo repetitivo en las neuronas neocorticales de proyección es un evento que depende directamente de la entrada de Ca^{2+} . La adición de un bloqueador de dichos canales (Cd^{2+}) produce un marcado incremento en la frecuencia de disparo disminuyendo la duración del intervalo inter-espigas (PPH). A) Un solo PA seguido de su PPH en control y en presencia de Cd^{2+} posteriormente su recuperación parcial. B) La frecuencia de disparo se incrementa en presencia de Cd^{2+} . El disparo repetitivo depende directamente de la entrada de Ca^{2+} ; el bloqueo de dicha entrada permite el incremento del número de potenciales de acción con la misma intensidad de corriente

Planteamiento del problema

Se ha demostrado en diversas neuronas del SNC que uno de los efectos moduladores del neuropéptido somatostatina es disminuir las corrientes entrantes de Ca^{2+} .

En el neocórtex, existe una población de interneuronas que sintetizan y liberan este péptido intrínsecamente al núcleo, realizando conexiones sinápticas con las neuronas espinosas medianas de proyección, la población principal de neuronas. Para mantener su disparo repetitivo, dichas neuronas, dependen del postpotencial hiperpolarizante, el cual limita la frecuencia de disparo y está modulado por la entrada de Ca^{2+} .

Con base en los efectos reportados para la somatostatina en otras neuronas del SNC, se puede pensar que la acción de este péptido sobre las neuronas estriatales de proyección sea una disminución en la entrada de Ca^{2+} que modifica la duración del postpotencial hiperpolarizante y por consiguiente lleva a una alteración en la frecuencia de disparo.

Objetivos

- Determinar si existe una modulación del postpotencial hiperpolarizante (PPH) y del patrón temporal de disparo de las neuronas espinosas de proyección en presencia de somatostatina.
- Determinar si existe modulación de las conductancias de Ca^{2+} por somatostatina en las neuronas del neocórtex.
- Adicionalmente, evidenciar si el efecto de la somatostatina sobre las neuronas estriatales de proyección es postsináptico.

Material y Método

Para la realización de los experimentos del presente trabajo se utilizaron rebanadas de cerebro de rata mantenidas *in vitro*, según el método estandarizado en el laboratorio (Galarraga *et al.*, 1989). En breve, ratas albinas Wistar (100-120 g de peso) fueron anestesiadas y decapitadas removiendo su cerebro a una solución salina mantenida a 4°C (ver más adelante). Se obtuvieron rebanadas parasagitales de cerebro de 400 μm de grosor cortadas en un vibratomo Pelco Serie 1000 y depositadas en una solución artificial cerebroespinal a 22°C. Dicha solución contenía (en mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 11 glucosa (300 mOsm/l con glucosa, pH 7.4 después de burbujear con 95% O₂ /5% CO₂, a 32–34°C). La Somatostatina utilizada fue de Laboratorios Peninsula (Belmont, CA) SOM-28 (1-14). El Cloruro de Tetraetilamonio (TEA) y la Tetrodotoxina (TTX) fueron de Sigma (St. Louis, MO.) Los registros intracelulares fueron realizados con microelectrodos llenados con acetato de potasio (3-4 M) con una resistencia de 80-120 M Ω . Para la obtención de los mismos se utilizaron capilares de borosilicato FHC Brunswick en un estirador de pipetas Brown/Flaming P-87 de Sutter Instruments. En algunos casos los electrodos fueron llenados con biocitina y esta fue inyectada a la célula registrada como ha sido descrito previamente (Horikawa y Armstrong, 1988; Flores-Hernandez *et al.*, 1994) para su posterior reconstrucción. Los registros fueron obtenidos mediante un electrómetro de puente activo (Neuro Data Instruments), digitalizados y grabados en una cinta VHS a 40 Khz para ser analizados fuera de línea con la ayuda de una PC y programas diseñados bajo el ambiente Lab View (National Instruments, Austin TX). El procesamiento final de los datos se realizó con el software para PC Origin 4.1 32 Bit (Microcal Software, Inc) y Sigma Plot 2.0 (Jandel Corp.).

La estimulación experimental constó de pulsos cuadrados despolarizantes de corriente a diferentes potenciales de mantenimiento que, una vez escogidos, se mantuvieron invariables.

Las sustancias utilizadas durante los experimentos fueron a las siguientes concentraciones: Somatostatina 1 μM , TEA 20 mM y TTX 1 μM .

Protocolos experimentales

Se realizaron diversas manipulaciones experimentales para evidenciar los efectos moduladores de la somatostatina sobre las neuronas estriatales de proyección. Dichas manipulaciones fueron dirigidas para evidenciar los efectos tanto en la duración como la amplitud del postpotencial hiperpolarizante ó en el incremento ó alteración del patrón temporal de disparo a diversos potenciales de mantenimiento. En otros casos las manipulaciones se realizaron para evidenciar la acción de la somatostatina sobre las conductancias entrantes de Ca^{2+} ó para mostrar los efectos moduladores eliminando la transmisión sináptica, dejando solamente los efectos postsinápticos.

Protocolo experimental 1

Se obtuvieron curvas I/V (relación corriente-voltaje), para registrar los cambios de resistencia intracelular (R_N); los cambios de resistencia son evidencia de la apertura o cierre de canales iónicos.

Realizado el empale de la célula se mantuvo ésta a su potencial de membrana, y se inyectaron pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes de corriente a diferentes intensidades. La duración de los pulsos cuadrados de corriente fue de 320 ms. La intensidad de la corriente se incrementó hasta alcanzar el umbral de disparo. La resistencia de entrada (R_N) se obtuvo de la relación $I-V$ como pendiente- R_N . Para realizar esto, un polinomio de la forma:

$$V_m(i) = A_1 i^n + A_2 i^{n-1} + \dots + A_n i + MP$$

fue ajustado a la relación $I-V$. Donde $V_m(i)$ es la respuesta del potencial de membrana como una función de la corriente intracelular inyectada i . A_1-A_n son coeficientes polinomiales. El último término constante MP es el potencial de mantenimiento, mientras que el último coeficiente A_n , corresponde a la resistencia de entrada en el potencial de mantenimiento. La R_N se evaluó como la derivada de esta función. Como la curva $I-V$ exhibe cambios de pendiente, la R_N es vista como dependiente del potencial de membrana. Los ajustes se realizaron cuando $r > 0.99$.

Protocolo experimental 2

Se obtuvo un sólo potencial de acción seguido por su postpotencial hiperpolarizante, inducido por un breve pulso despolarizante. La célula se mantuvo apenas por debajo del umbral de disparo espontáneo de las neuronas (-45 mV, aproximadamente) inyectando corriente directa a la célula (DC) mediante el electrodo de registro.

Protocolo experimental 3

La célula se fijó a un potencial de mantenimiento de -60 mV. Mediante pulsos fijos de corriente despolarizantes de 320 ms de duración, se obtuvieron trenes de disparo de PA's (entre 7-9 en condición control) y posteriormente en presencia de somatostatina. La intensidad de corriente despolarizante aplicada no varió durante el experimento.

Para realizar la curva Intensidad-Frecuencia, se hizo una modificación al protocolo experimental 3. Una vez fijado el potencial de mantenimiento se dieron pulsos de corriente supraumbrales de mayor intensidad hasta alcanzar la pérdida total de latencia de disparo. Este protocolo se realizó antes y después del tratamiento.

Protocolo experimental 4

Se realizó una serie de registros en presencia de TEA 20 mM, generando un PA con un componente predominantemente de Ca^{2+} . Dichos registros fueron realizados en un potencial de mantenimiento de -70 mV. El potencial de Ca^{2+} generado en presencia de TEA se sometió a somatostatina para evidenciar los efectos del péptido sobre su duración. Adicionalmente se realizó una modificación a este mismo protocolo experimental adicionando TTX eliminando así cualquier actividad sináptica o efecto indirecto.

En todos los protocolos descritos previamente los experimentos se realizaron tanto en condición control como en presencia de somatostatina, comparando el efecto registrado sobre la misma célula. En algunos casos la condición control se realizó en presencia de TEA y en otros casos dicha condición fue en presencia de TEA+TTX.

Resultados

Se registraron 25 neuronas espinosas medianas de proyección para evidenciar los efectos moduladores de la SOM sobre el postpotencial hiperpolarizante, la frecuencia de disparo neuronal, la modulación de las conductancias de Ca^{2+} y los cambios en la resistencia de entrada de la célula. Los experimentos fueron realizados en condiciones control y en presencia de somatostatina.

Características electrofisiológicas de las neuronas del neostriado.

La figura 9 muestra las características electrofisiológicas de una neurona representativa registrada durante la realización del presente trabajo. Dichas características concuerdan con las descritas previamente (Wilson, CG 1992; Galarraga *et al.*, 1994) para las neuronas estriatales medianas de proyección. En la parte superior (A), se muestran los pulsos de corriente inyectados a la célula registrada. Dichos pulsos son despolarizantes (hacia arriba) e hiperpolarizantes (hacia abajo). (B) La respuesta a la estimulación se muestra en forma de cambios del voltaje. El incremento en la intensidad de los pulsos despolarizantes se realizó hasta alcanzar el umbral de disparo de la neurona registrada. Los cambios de voltaje en respuesta a los pulsos hiperpolarizantes se encuentran limitados por la rectificación entrante de la neurona. La relación I-V fue graficada (C) para obtener la resistencia de entrada de la célula. Dicha relación no es lineal debido a las variaciones en las conductancias membranales. La resistencia de entrada (R_N) proporciona información acerca del estado general de la célula al comenzar los registros. En términos generales, la R_N registrada en condición control fue de $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$ ($n = 14$) y el potencial de membrana de las células fue de $85.46 \pm 4.26 \text{ mV}$ ($n = 14$).

La figura 10 muestra la respuesta de una neurona de proyección del neostriado a la inyección de pulsos de corriente de diferente intensidad. En todos los casos la duración del pulso de corriente es la misma (320 ms). Un incremento en la intensidad de la corriente aplicada a través del microelectrodo de registro se ve reflejado en un aumento del número de potenciales de acción evocados (10 A-D). De manera paralela a este incremento de potenciales de acción, hay una disminución en la latencia al primer potencial de acción y una disminución de la duración del postpotencial hiperpolarizante que sigue a cada disparo.

Resultados

Se registraron 25 neuronas espinosas medianas de proyección para evidenciar los efectos moduladores de la SOM sobre el postpotencial hiperpolarizante, la frecuencia de disparo neuronal, la modulación de las conductancias de Ca^{2+} y los cambios en la resistencia de entrada de la célula. Los experimentos fueron realizados en condiciones control y en presencia de somatostatina.

Características electrofisiológicas de las neuronas del neostriado.

La figura 9 muestra las características electrofisiológicas de una neurona representativa registrada durante la realización del presente trabajo. Dichas características concuerdan con las descritas previamente (Wilson, CG 1992; Galarraga *et al.*, 1994) para las neuronas estriatales medianas de proyección. En la parte superior (A), se muestran los pulsos de corriente inyectados a la célula registrada. Dichos pulsos son despolarizantes (hacia arriba) e hiperpolarizantes (hacia abajo). (B) La respuesta a la estimulación se muestra en forma de cambios del voltaje. El incremento en la intensidad de los pulsos despolarizantes se realizó hasta alcanzar el umbral de disparo de la neurona registrada. Los cambios de voltaje en respuesta a los pulsos hiperpolarizantes se encuentran limitados por la rectificación entrante de la neurona. La relación I-V fue graficada (C) para obtener la resistencia de entrada de la célula. Dicha relación no es lineal debido a las variaciones en las conductancias membranales. La resistencia de entrada (R_N) proporciona información acerca del estado general de la célula al comenzar los registros. En términos generales, la R_N registrada en condición control fue de $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$ ($n = 14$) y el potencial de membrana de las células fue de $85.46 \pm 4.26 \text{ mV}$ ($n = 14$).

La figura 10 muestra la respuesta de una neurona de proyección del neostriado a la inyección de pulsos de corriente de diferente intensidad. En todos los casos la duración del pulso de corriente es la misma (320 ms). Un incremento en la intensidad de la corriente aplicada a través del microelectrodo de registro se ve reflejado en un aumento del número de potenciales de acción evocados (10 A-D). De manera paralela a este incremento de potenciales de acción, hay una disminución en la latencia al primer potencial de acción y una disminución de la duración del postpotencial hiperpolarizante que sigue a cada disparo.

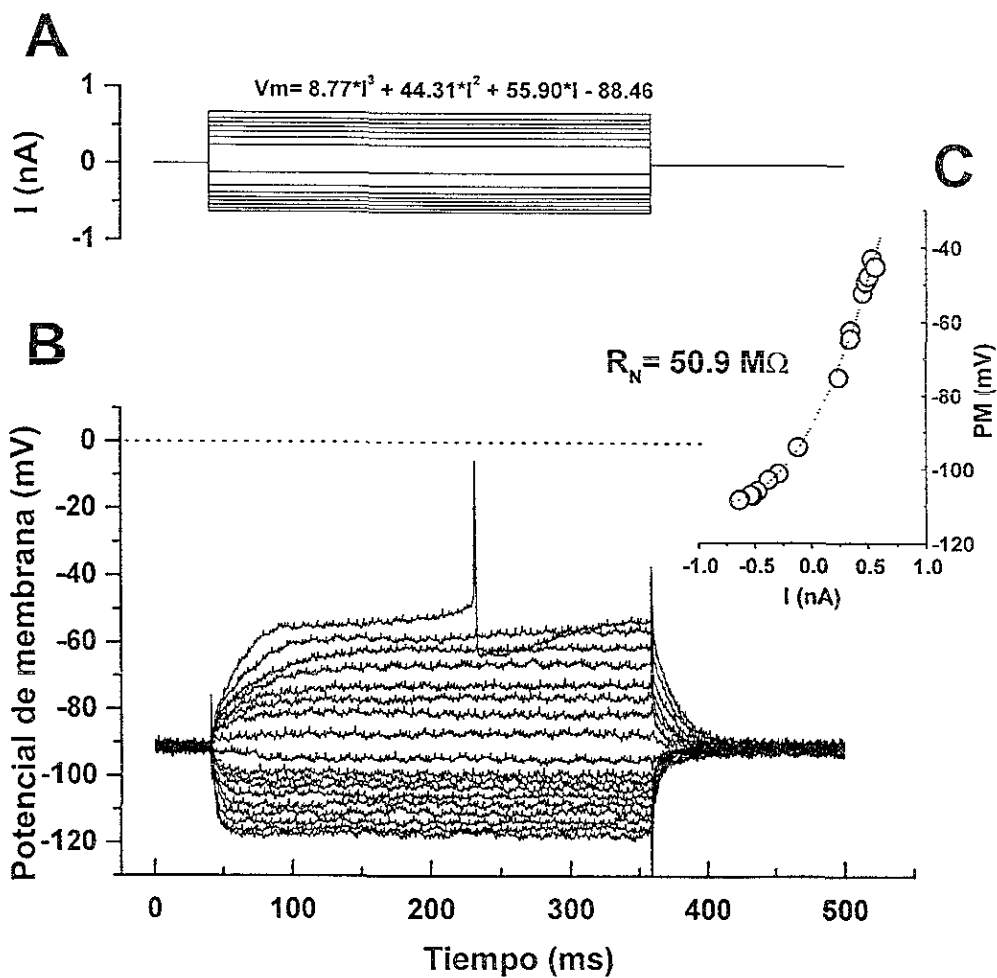


Figura 9. Curva I/V de una neurona espinosa mediana de proyección. A) Pulsos de corriente inyectados a través del microelectrodo de registro. B) Trazos de voltaje registrados como respuesta a la corriente inyectada. C) Ajuste de la curva I/V y su resistencia de entrada (R_N). En términos generales la R_N en condición control fue de $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$. El ajuste del polinomio de 3er orden se encuentra por encima de los trazos de corriente.

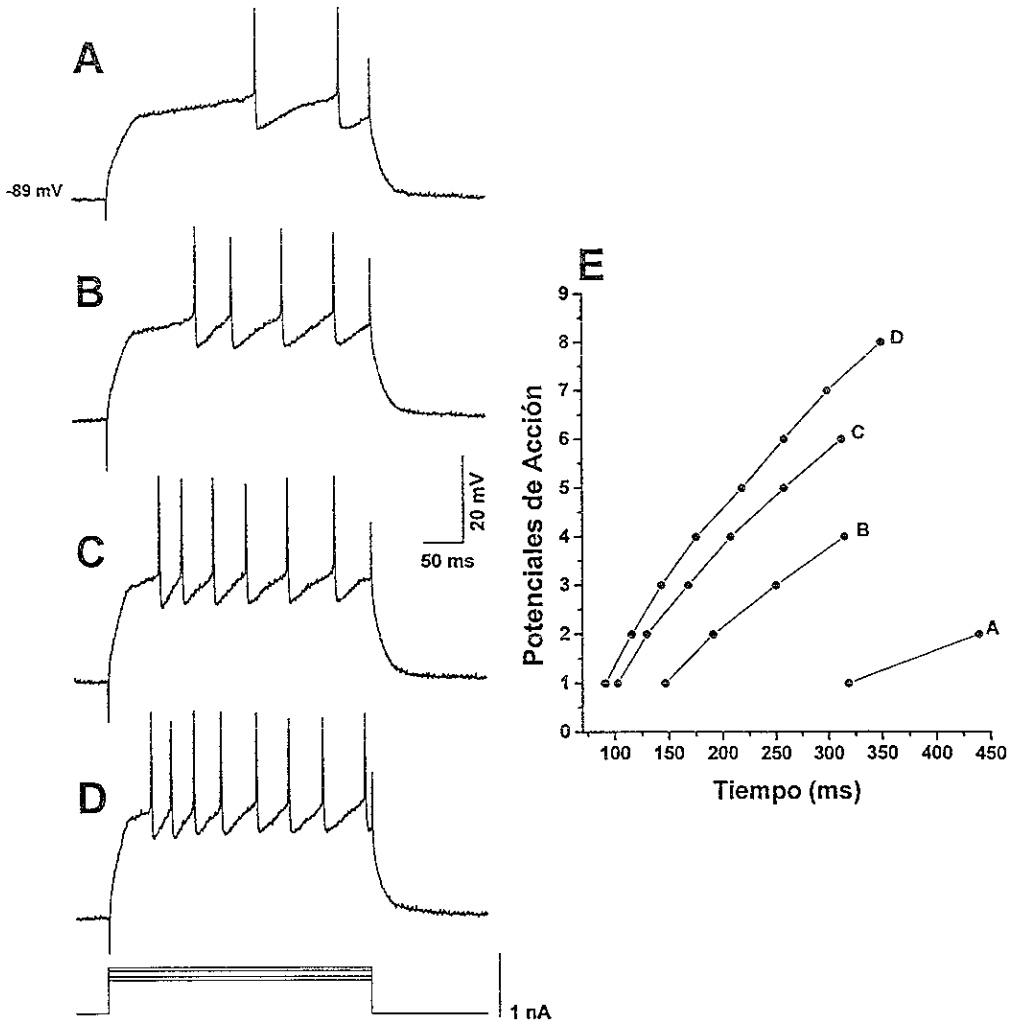


Figura 10. Relación Corriente – Frecuencia (I-F). El incremento en la corriente supraumbrales genera un aumento en el número de potenciales de acción (A-D). Los trenes de Pa's fueron obtenidos de la misma célula. (E) Gráfica de número de potenciales de acción vs tiempo de estimulación.

La adaptación de la frecuencia está evidenciada en los incisos B-D de la figura 10, donde se puede apreciar que el intervalo interespigas entre el primer y el segundo potencial de acción es de menor duración que el mismo intervalo entre el penúltimo y el último potencial. El aumento en la duración de este periodo de tiempo entre cada espiga es una evidencia del fenómeno de adaptación de las neuronas estriatales de proyección (Wilson *et al.*, 1990; Pineda *et al.*, 1992).

En la figura 10-C y D el incremento en el pulso de corriente ha disminuido la latencia al primer PA, mientras que el postpotencial hiperpolarizante que sigue a cada disparo ha disminuido considerablemente. La figura 10-D muestra una drástica disminución en la duración del postpotencial hiperpolarizante; la intensidad de la corriente supraumbrales ha provocado la pérdida de la latencia en el disparo y simultáneamente un marcado incremento en la frecuencia de disparo. Dicho incremento en el número de potenciales de acción está cuantificado en gráfica 10-E. Así pues, a una menor intensidad de corriente supraumbrales, el tiempo que tarda en aparecer el primer potencial de acción es mayor que el tiempo que tarda cuando la corriente es mayor. Mientras que en 10-A el primer potencial de acción tarda 320 ms en aparecer, en 10-D tiene un retraso de 91 ms. La corriente en 10-A fue de 0.6 nA, en 10-B 0.67 nA, en 10-C 0.77 y en 10-D 0.85 nA respectivamente.

La existencia del fenómeno de adaptación es una evidencia de la activación de conductancias lentas que participan activamente en el patrón temporal de disparo de las neuronas del neocórtex. Cuando se aplican altas intensidades de corriente supraumbrales, los trazos se vuelven menos lineales, esto es una evidencia de la adaptación en el disparo neuronal.

El postpotencial hiperpolarizante ha sido identificado como otro de los factores determinantes del ritmo y la frecuencia de disparo neuronal. La morfología del postpotencial hiperpolarizante varía entre las diferentes poblaciones neuronales, y dicha variabilidad se debe a la contribución de diferentes conductancias iónicas que participan en su generación.

En las neuronas estriatales de proyección existen dos fases del postpotencial hiperpolarizante; la primera es muy rápida y sigue inmediatamente después de la generación del PA (PPH_R), mientras que la segunda es mucho más lenta y genera al postpotencial hiperpolarizante lento, esta fase dura aproximadamente 250 ms (PPH_L) (Pineda *et al.*, 1992). La figura 11 muestra las dos fases del postpotencial hiperpolarizante. Mientras que la fase rápida (PPH_R) sigue al potencial de acción y no dura más de 2 ms, la fase lenta (PPH_L) genera el intervalo inter-espigas y puede durar hasta 250 ms.

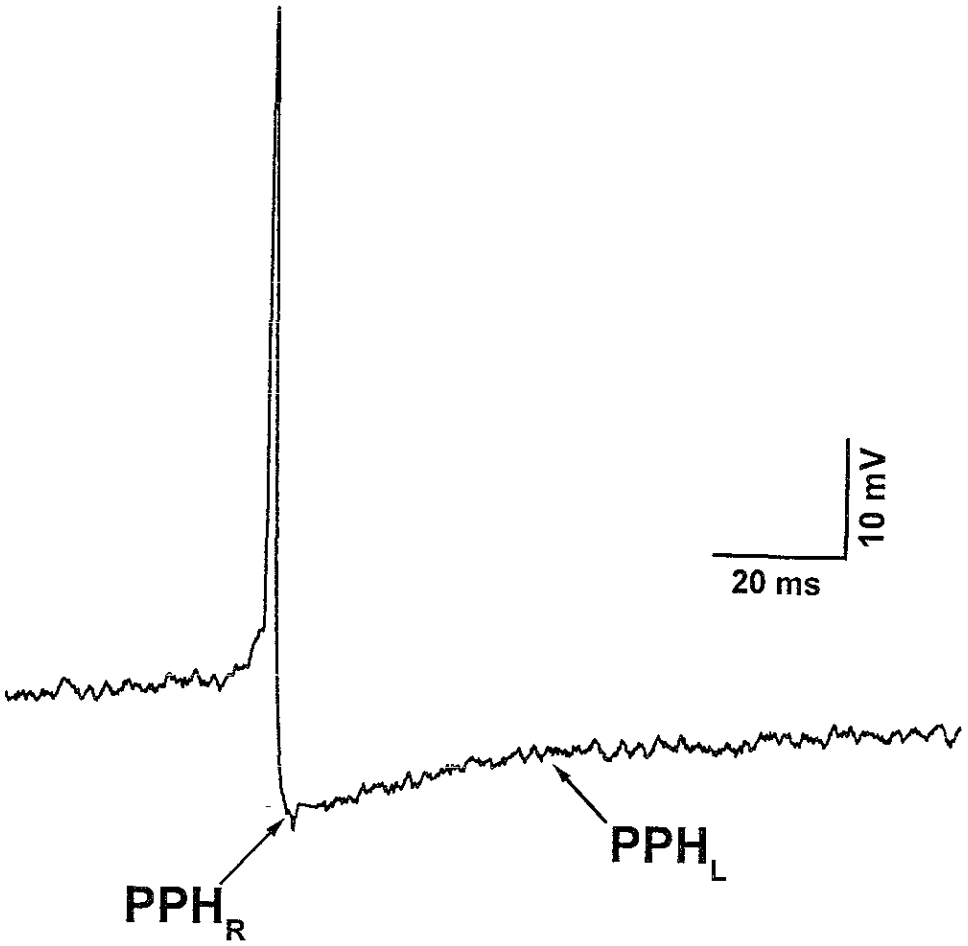


Figura 11. Las distintas fases del postpotencial hiperpolarizante que siguen al potencial de acción. La fase rápida (PPH_R) se encuentra mediada por canales BK, dura de 1 a 2 ms, mientras que la fase lenta (PPH_L) se encuentra mediada por canales SK y puede durar hasta 250 ms.

Efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante en las neuronas del neostriado

Para probar el efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un potencial de acción, se realizaron una serie de experimentos siguiendo el método descrito previamente (protocolo experimental 2). La figura 12 muestra el efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante. En la parte superior se muestra el pulso de corriente inyectado. En (A) se muestra la condición control en un potencial de mantenimiento de -50 mV; La amplitud control promedio del PPH fue de -6.152 ± 0.15 mV. Después del PA evocado por el pulso de corriente se encuentra el postpotencial hiperpolarizante en presencia de SOM ($1\mu\text{M}$), cuya amplitud promedio fue de -4.187 ± 0.345 mV; (B) lo que representa una disminución en la amplitud de dicho evento. La flecha sobre el registro en presencia de somatostatina muestra un incremento en la fase rápida del PPH no visible en condición control. La sobreposición de dicho registro y en presencia de somatostatina se encuentra en (C). Durante toda la serie de experimentos realizados, 100% de las células experimentaron una disminución en la amplitud del postpotencial hiperpolarizante. El inserto D, muestra un diagrama de caja mostrando la disminución de la amplitud del PPH en presencia de somatostatina. Dicha disminución equivale a $32.220 \pm 4.561\%$ de la amplitud control del mismo ($n = 6$).

Amplitud Control (mV)	Somatostatina (mV)	% disminución
-6.152 ± 0.15	-4.187 ± 0.345	32.220 ± 4.561

Tabla 1. El efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante de las neuronas espinosas medianas de proyección. En todos los casos, la fase lenta del PPH fue el blanco de modulación del péptido ($n = 6$).

Acción de la somatostatina sobre patrón temporal de disparo.

Para probar la acción de la somatostatina sobre el patrón temporal de disparo se realizó una serie de registros siguiendo los protocolos descritos previamente (ver protocolo experimental 3).

Efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante en las neuronas del neocórtex

Para probar el efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un potencial de acción, se realizaron una serie de experimentos siguiendo el método descrito previamente (protocolo experimental 2). La figura 12 muestra el efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante. En la parte superior se muestra el pulso de corriente inyectado. En (A) se muestra la condición control en un potencial de mantenimiento de -50 mV; La amplitud control promedio del PPH fue de -6.152 ± 0.15 mV. Después del PA evocado por el pulso de corriente se encuentra el postpotencial hiperpolarizante en presencia de SOM ($1\mu\text{M}$), cuya amplitud promedio fue de -4.187 ± 0.345 mV; (B) lo que representa una disminución en la amplitud de dicho evento. La flecha sobre el registro en presencia de somatostatina muestra un incremento en la fase rápida del PPH no visible en condición control. La sobreposición de dicho registro y en presencia de somatostatina se encuentra en (C). Durante toda la serie de experimentos realizados, 100% de las células experimentaron una disminución en la amplitud del postpotencial hiperpolarizante. El inserto D, muestra un diagrama de caja mostrando la disminución de la amplitud del PPH en presencia de somatostatina. Dicha disminución equivale a $32.220 \pm 4.561\%$ de la amplitud control del mismo ($n = 6$).

Amplitud Control (mV)	Somatostatina (mV)	% disminución
-6.152 ± 0.15	-4.187 ± 0.345	32.220 ± 4.561

Tabla 1. El efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante de las neuronas espinosas medianas de proyección. En todos los casos, la fase lenta del PPH fue el blanco de modulación del péptido ($n = 6$).

Acción de la somatostatina sobre patrón temporal de disparo.

Para probar la acción de la somatostatina sobre el patrón temporal de disparo se realizó una serie de registros siguiendo los protocolos descritos previamente (ver protocolo experimental 3).

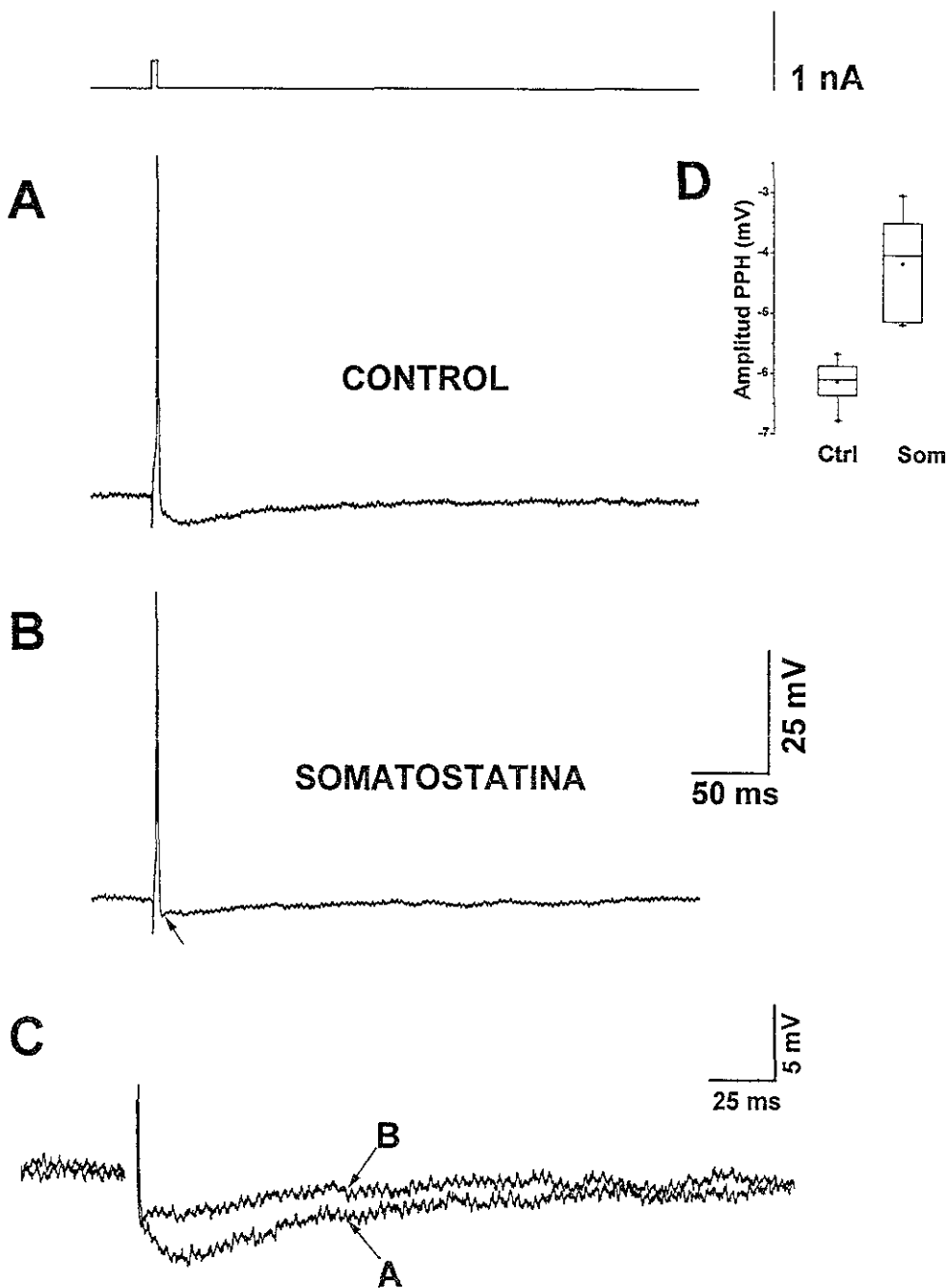


Figura 12. El PPH que sigue a un solo PA. A) En condición control el PPH tuvo una duración de -6.152 ± 0.15 mV. B) En presencia de SOM $1 \mu\text{M}$ la amplitud disminuyó hasta -4.187 ± 0.345 mV. C) Sobreposición del PPH control (A) y experimental (B). D) El gráfico de caja muestra la diferencia significativa entre la amplitud del PPH. Las flechas en (B) muestran la acentuación del PPH_R , no visible en condición control.

Sobre un tren de disparo, la aplicación de somatostatina al medio de perfusión (1 μ M) produjo un incremento en la frecuencia de disparo. La respuesta evocada a través de un pulso despolarizante de corriente de 320 ms de duración en un potencial de mantenimiento de ~ -60 mV tuvo efecto en 100% de las células registradas; la frecuencia de disparo en condición control fue de 21.875 ± 1.97 Hz. En presencia de somatostatina, la frecuencia de disparo fue de 29.68 ± 2.99 Hz. Dicho incremento en la frecuencia de disparo representa 35.634 ± 4.97 %. Del total de las células sometidas a este protocolo de estimulación 72% mostró un incremento en la frecuencia de disparo (n = 8). La figura 13 muestra el registro de una célula representativa. En la parte superior (A) el registro control de un tren de potenciales de acción; el incremento en la frecuencia de disparo en presencia de somatostatina está registrado en (B). Las flechas en el registro en presencia de SOM muestran un acentuamiento de la fase rápida del PPH; este evento no es evidente en condición control. El diagrama de caja muestra el incremento en la frecuencia de disparo.

El 28% restante de las células registradas presentó solamente una alteración de la frecuencia de disparo, dicha alteración resultó en la irregularidad del mismo y en la aparición de una serie de oscilaciones membranales. Tales oscilaciones produjeron una disminución en el número de potenciales de acción en presencia de somatostatina (ver más adelante).

Frecuencia (Hz) Control	Frecuencia (Hz) Somatostatina	% de incremento
21.875 ± 1.97	29.68 ± 2.99	35.634 ± 4.97

Tabla 2. Incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas medianas de proyección en presencia de somatostatina.

La relación entre la frecuencia de disparo y corriente inyectada (curva I-F), también presentó incremento en presencia de somatostatina (figura 14). El disparo provocado se realizó con pulsos de corriente supraumbral de cada vez mayor intensidad en la misma neurona. Tanto en control (A) como en presencia de somatostatina (B), la corriente es similar, sin embargo la frecuencia de disparo se ve incrementada en presencia del péptido.

El aumento en la relación frecuencia de disparo contra la corriente inyectada (curva I-F) es apreciable tanto en los primeros intervalos inter-espigas (15-A) como en los últimos (15-B).

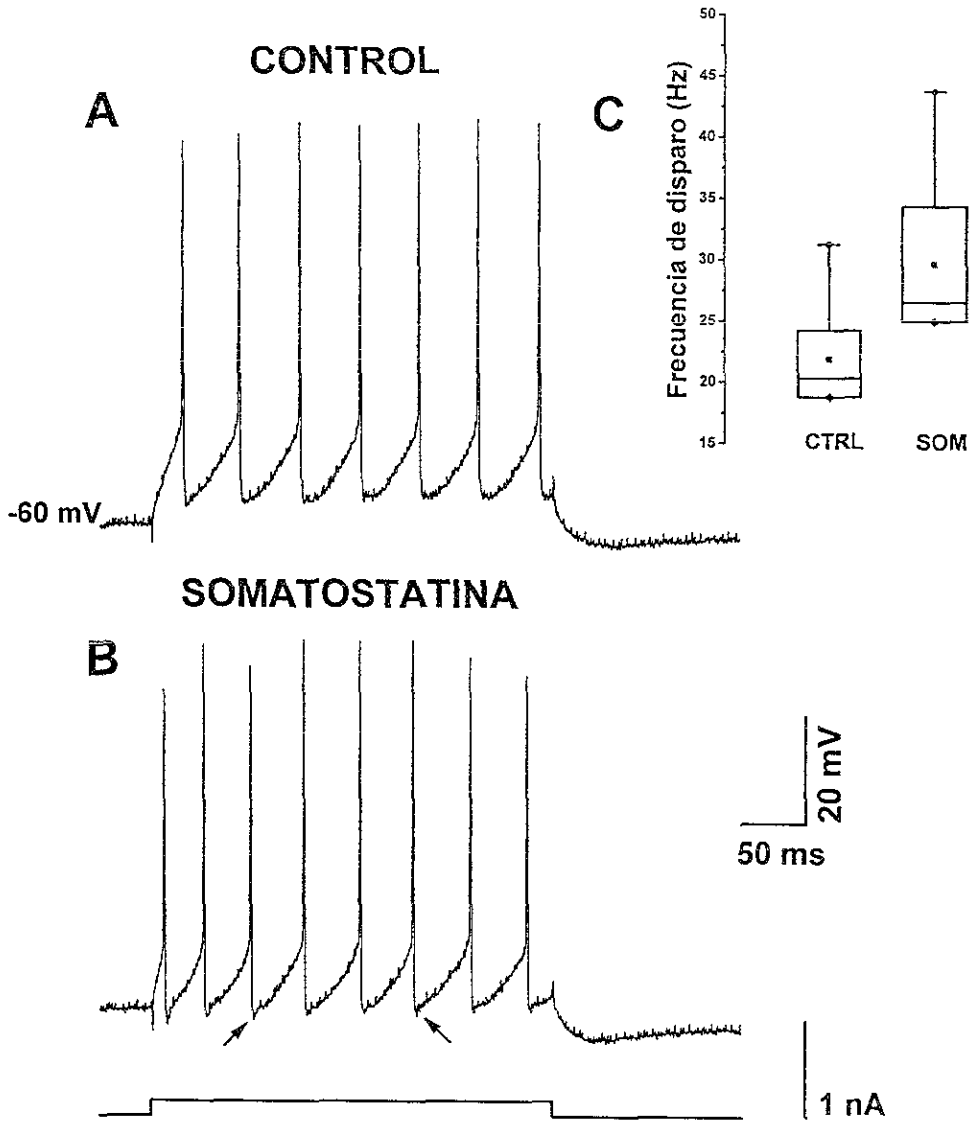


Figura 13. Acción de la somatostatina en un tren de PA's. A) En condición control, la frecuencia de disparo fue de 21.875 ± 1.97 Hz. B) En presencia de SOM $1 \mu\text{M}$ la frecuencia de disparo aumentó a 29.68 ± 2.99 Hz. En presencia de SOM la fase rápida del PPH presenta una acentuación (flechas) La frecuencia de disparo presentó diferencias significativas (C).

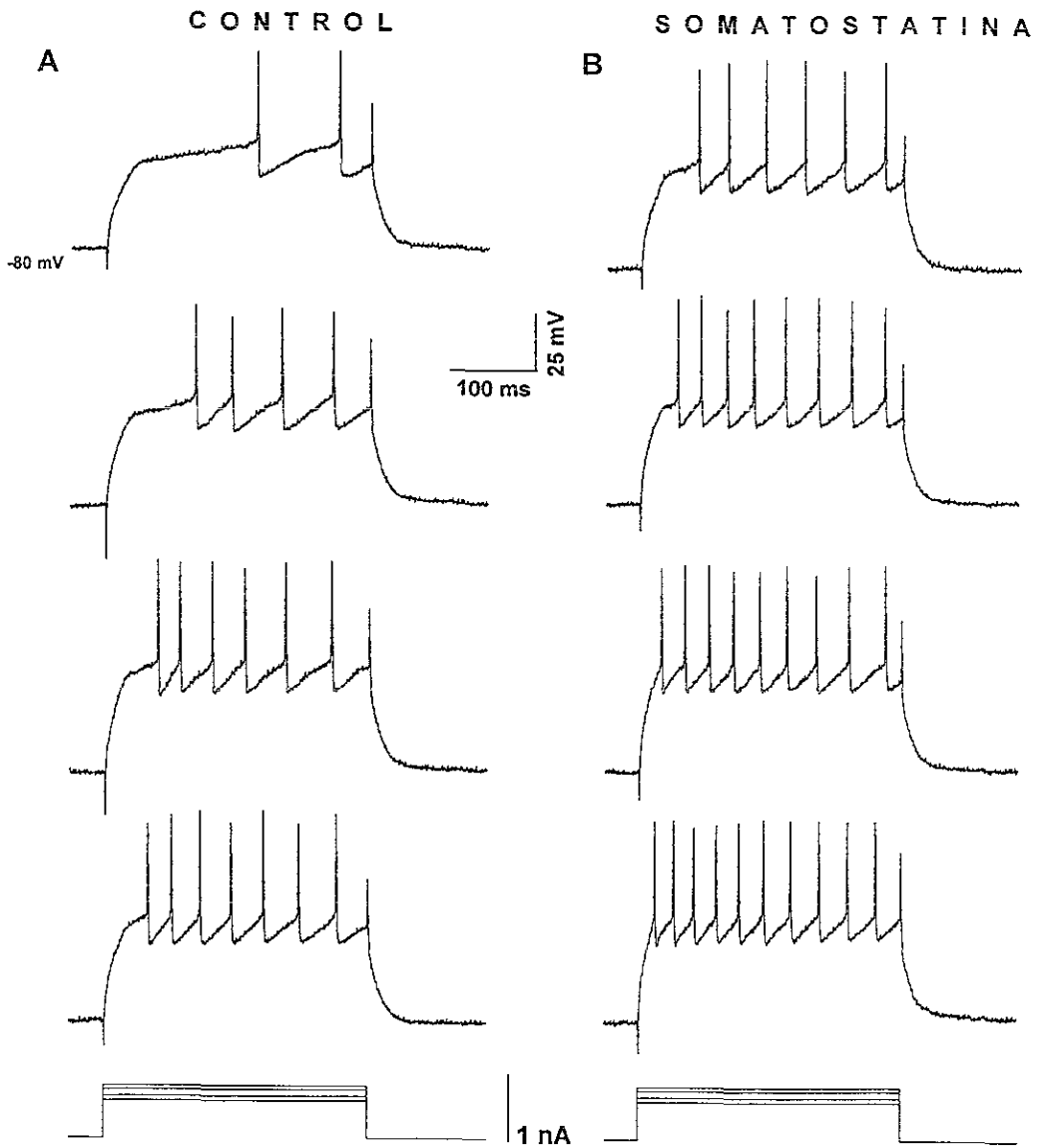


Figura 14. Relación Corriente-Frecuencia de disparo. En ambos casos la corriente inyectada es similar, sin embargo, en presencia de SOM $1\mu\text{M}$ el patrón temporal de disparo se incrementa disminuyendo el intervalo inter-espigas (PPH). En ambos casos, el potencial de mantenimiento fue de -80 mV .

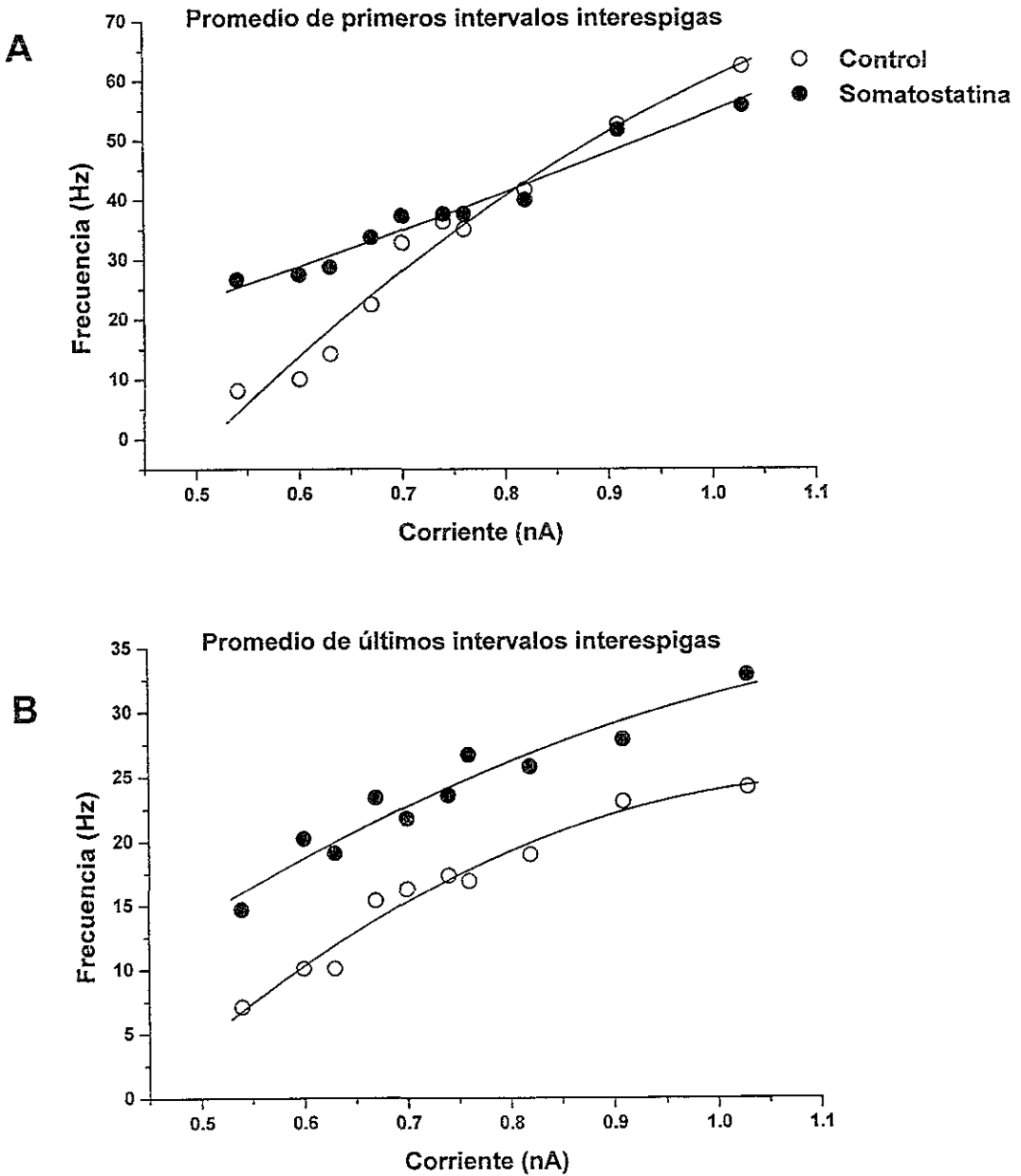


Figura 15. Gráficas de Corriente vs Frecuencia de disparo. (A) Promedio de la duración de los primeros intervalos inter-espigas. En los primeros intervalos el cambio no es tan visible como en los últimos intervalos (B), donde la adaptación ha disminuido y la gráfica se ha desplazado (en la frecuencia) como consecuencia del aumento del número de potenciales de acción.

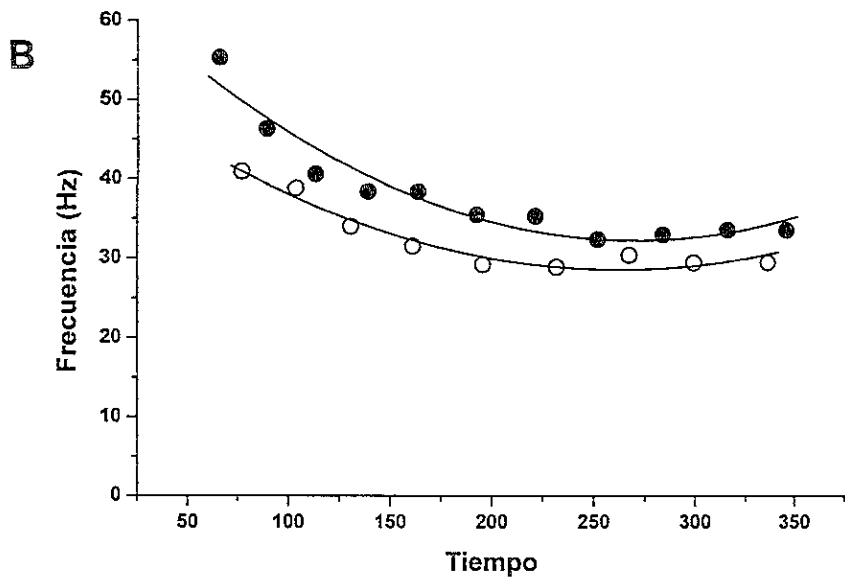
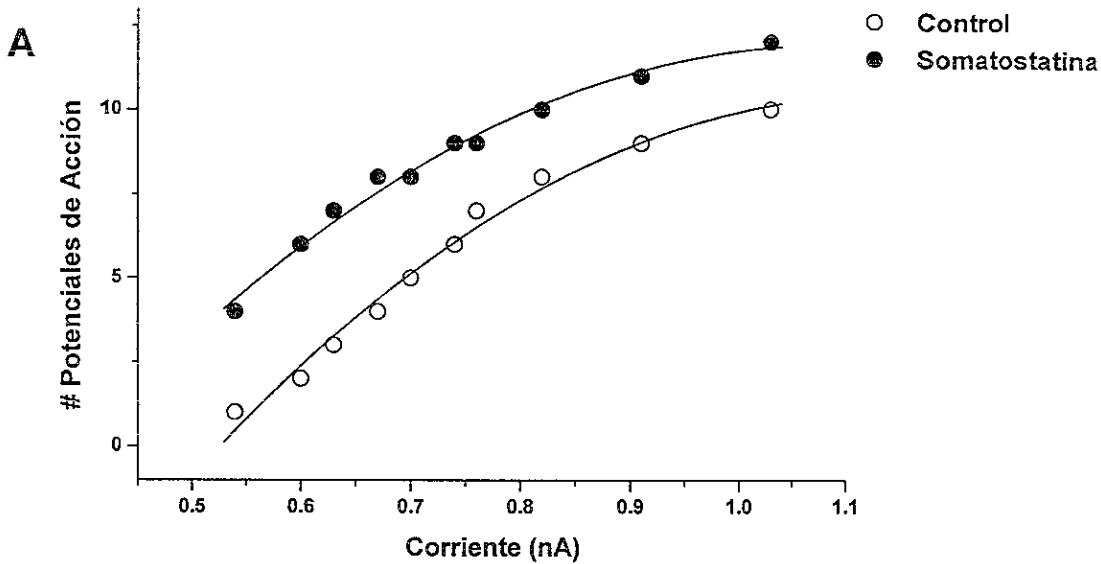


Figura 16. La corriente necesaria para evocar potenciales de acción disminuye en presencia de somatostatina $1 \mu\text{M}$ (A). Otro fenómeno afectado directamente por la SOM es la adaptación del disparo neuronal; sin embargo, aún en presencia del péptido se sigue observando este fenómeno (B).

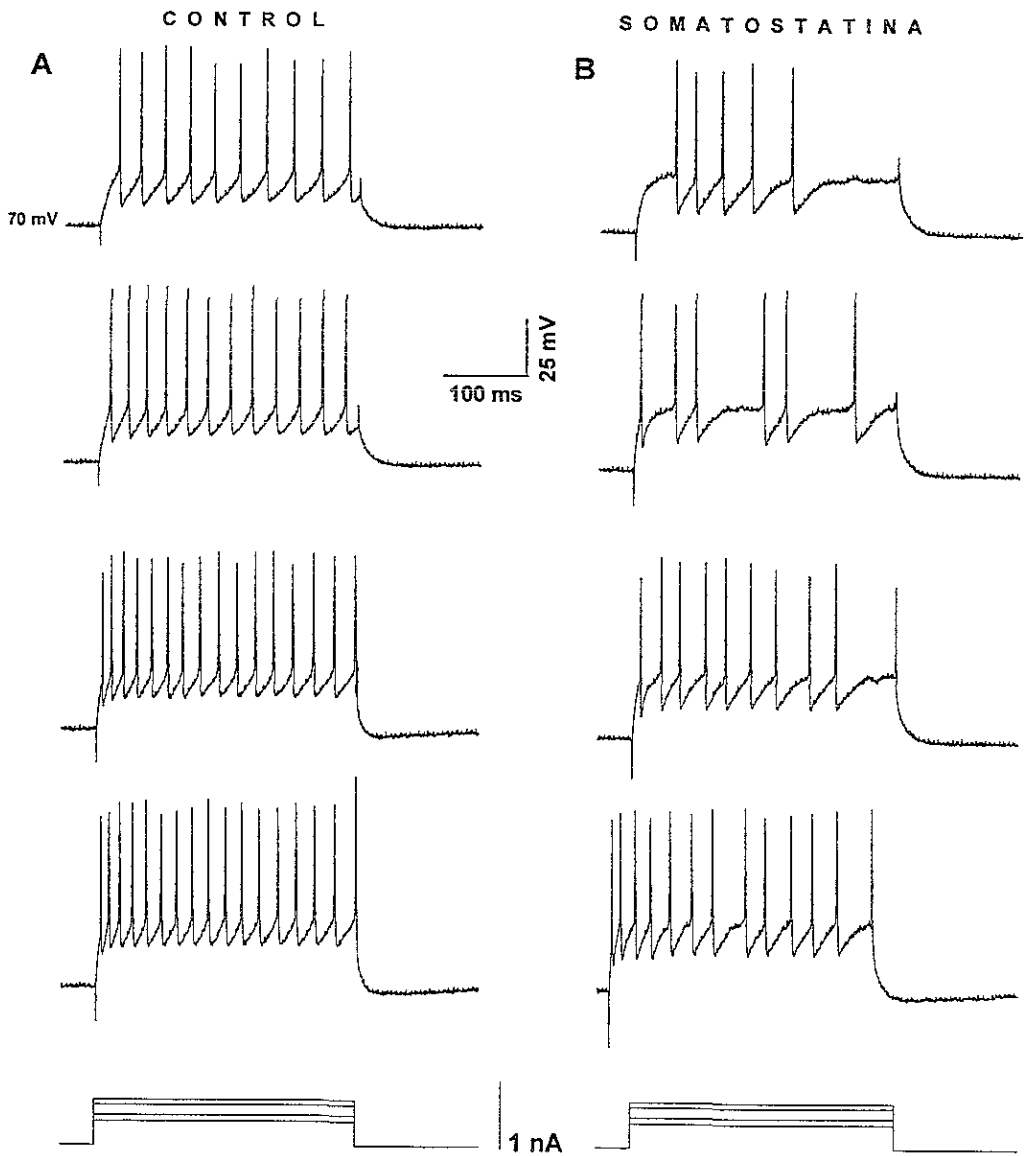


Figura 17. La alteración en la frecuencia de disparo en presencia de somatostatina fue un fenómeno observado en el 28% de las células registradas; Dicha alteración resultó en la aparición de oscilaciones membranales. En ambos casos (control y som) la célula y la corriente es la misma.

En condición control, durante los primeros intervalos interespigas la frecuencia de disparo es mayor que durante los últimos intervalos interespigas. Este evento explica la participación diferencial de las dos fases del PPH en la generación del patrón temporal de disparo de las neuronas de proyección del neocórtico. Mientras que en los primeros PA's la frecuencia de disparo llega hasta los 70 Hz, en los últimos intervalos dicha frecuencia no rebasa los 25 Hz (Fig 15 A-B). En presencia de SOM la duración de los primeros intervalos disminuye, incrementando por consiguiente, la frecuencia de disparo (15-A). Dicho fenómeno sugiere una potenciación del PPH_R mediado por canales BK.

Durante la generación de las últimas espigas de PA's el intervalo de tiempo entre PA's es mayor generando así, una disminución en la frecuencia de disparo. Esta fase mediada principalmente por el PPH_L se ve incrementada en presencia de somatostatina (15-B); dicho aumento en la frecuencia de disparo es inversamente proporcional a la disminución de la amplitud del PPH mediada por canales SK (Pineda *et al.*, 1992).

La figura 16-A muestra que la cantidad de corriente necesaria para evocar el disparo neuronal disminuye en presencia de somatostatina. La disminución del intervalo interespigas tanto de los primeros como de los últimos PA's permite ver la disminución en la adaptación del disparo neuronal en presencia del péptido (16-B). El ajuste realizado en estas curvas es de segundo orden.

En otros casos, la acción de la somatostatina fue producir un disparo con tendencia a la adaptación, disparo irregular ó en ráfagas de PA's acompañados de periodos silentes, dichos eventos generaron una adaptación en el disparo neuronal (figura 17-B).

Efecto de la somatostatina sobre el Potencial de Acción de Ca²⁺

Como ha sido reportado previamente, la aplicación extracelular de Tetraetilamonio (20 mM) al medio de perfusión induce la generación de un potencial de acción de Calcio (Hernández-López *et al.*, 1997); la acción de la somatostatina (1 μ M) fue probada entonces para obtener una prueba directa de la acción moduladora del péptido sobre las conductancias de Ca²⁺ cuantificando la duración del PA.

Los registros fueron realizados de acuerdo con lo descrito en el protocolo experimental 4. En presencia de TEA (20 mM) se obtuvo un solo PA; la duración promedio de dicho potencial fue de 193.440 ± 53.29 ms; posteriormente se aplicó somatostatina al medio de perfusión y se registró su efecto. En todas las células registradas (n=4) se observó una disminución de la duración de la espiga de Ca²⁺. La duración promedio del PA en presencia de somatostatina fue de 147.387 ± 47.19 ms, lo que

En condición control, durante los primeros intervalos interespigas la frecuencia de disparo es mayor que durante los últimos intervalos interespigas. Este evento explica la participación diferencial de las dos fases del PPH en la generación del patrón temporal de disparo de las neuronas de proyección del neocórtico. Mientras que en los primeros PA's la frecuencia de disparo llega hasta los 70 Hz, en los últimos intervalos dicha frecuencia no rebasa los 25 Hz (Fig 15 A-B). En presencia de SOM la duración de los primeros intervalos disminuye, incrementando por consiguiente, la frecuencia de disparo (15-A). Dicho fenómeno sugiere una potenciación del PPH_R mediado por canales BK.

Durante la generación de las últimas espigas de PA's el intervalo de tiempo entre PA's es mayor generando así, una disminución en la frecuencia de disparo. Esta fase mediada principalmente por el PPH_L se ve incrementada en presencia de somatostatina (15-B); dicho aumento en la frecuencia de disparo es inversamente proporcional a la disminución de la amplitud del PPH mediada por canales SK (Pineda *et al.*, 1992).

La figura 16-A muestra que la cantidad de corriente necesaria para evocar el disparo neuronal disminuye en presencia de somatostatina. La disminución del intervalo interespigas tanto de los primeros como de los últimos PA's permite ver la disminución en la adaptación del disparo neuronal en presencia del péptido (16-B). El ajuste realizado en estas curvas es de segundo orden.

En otros casos, la acción de la somatostatina fue producir un disparo con tendencia a la adaptación, disparo irregular ó en ráfagas de PA's acompañados de periodos silentes, dichos eventos generaron una adaptación en el disparo neuronal (figura 17-B).

Efecto de la somatostatina sobre el Potencial de Acción de Ca²⁺

Como ha sido reportado previamente, la aplicación extracelular de Tetraetilamonio (20 mM) al medio de perfusión induce la generación de un potencial de acción de Calcio (Hernández-López *et al.*, 1997); la acción de la somatostatina (1 μM) fue probada entonces para obtener una prueba directa de la acción moduladora del péptido sobre las conductancias de Ca²⁺ cuantificando la duración del PA.

Los registros fueron realizados de acuerdo con lo descrito en el protocolo experimental 4. En presencia de TEA (20 mM) se obtuvo un solo PA; la duración promedio de dicho potencial fue de 193.440 ± 53.29 ms; posteriormente se aplicó somatostatina al medio de perfusión y se registró su efecto. En todas las células registradas (n=4) se observó una disminución de la duración de la espiga de Ca²⁺. La duración promedio del PA en presencia de somatostatina fue de 147.387 ± 47.19 ms, lo que

representa 27.401 ± 4.46 % de disminución (figura 18-A). La condición control y la experimental se encuentran sobrepuestas. Nótese que la acción primaria del TEA (concentración 20mM) produce un incremento en la duración del PA y elimina la aparición del postpotencial hiperpolarizante, dejando en su lugar una repolarización lenta mantenida por la entrada de Ca^{2+} . El inserto muestra el diagrama de caja con la disminución en la duración del PA en presencia de somatostatina.

Control (TEA 20 mM)	Experimental TEA+ SOM	% de disminución
193.440 ± 53.29 ms	147.387 ± 47.19 ms	27.401 ± 4.46

Tabla 3. La disminución de la duración del potencial de Ca^{2+} inducido por TEA sigue presentando una reducción en su duración en presencia de SOM.

Efecto de la somatostatina sobre el PA de Ca^{2+} en presencia de TTX

En presencia de TEA (20 mM) y TTX ($1\mu M$) el PA restante es sólo de Ca^{2+} (Galarraga *et al.*, 1985). Bajo dicha situación, el valor promedio del potencial de Calcio fue de 140.99 ± 67.51 ms. La adición de somatostatina ($1\mu M$) al medio de perfusión produjo una disminución del potencial de Ca^{2+} ; esta reducción fue de 89.048 ± 46.85 ms. En un potencial de mantenimiento de ≈ -65 mV la disminución del potencial de Ca^{2+} representó $38.698 \pm 3.87\%$ ($n = 3$). La figura 18-B muestra una neurona representativa con los efectos del péptido sobre el PA de Ca^{2+} . El pulso de corriente despolarizante se encuentra en la parte inferior. En el inserto, el diagrama de caja muestra la disminución de la amplitud del potencial restante al agregar SOM.

Control TEA+TTX	Experimental TEA+TTX+SOM	% de disminución
140.99 ± 67.51 ms	89.048 ± 46.85 ms	38.698 ± 3.87

Tabla 4. Disminución del potencial de Ca^{2+} (TEA+TTX) en presencia de Somatostatina.

representa 27.401 ± 4.46 % de disminución (figura 18-A). La condición control y la experimental se encuentran sobrepuestas. Nótese que la acción primaria del TEA (concentración 20mM) produce un incremento en la duración del PA y elimina la aparición del postpotencial hiperpolarizante, dejando en su lugar una repolarización lenta mantenida por la entrada de Ca^{2+} . El inserto muestra el diagrama de caja con la disminución en la duración del PA en presencia de somatostatina.

Control (TEA 20 mM)	Experimental TEA+ SOM	% de disminución
193.440 ± 53.29 ms	147.387 ± 47.19 ms	27.401 ± 4.46

Tabla 3. La disminución de la duración del potencial de Ca^{2+} inducido por TEA sigue presentando una reducción en su duración en presencia de SOM.

Efecto de la somatostatina sobre el PA de Ca^{2+} en presencia de TTX

En presencia de TEA (20 mM) y TTX ($1\mu M$) el PA restante es sólo de Ca^{2+} (Galarraga *et al.*, 1985). Bajo dicha situación, el valor promedio del potencial de Calcio fue de 140.99 ± 67.51 ms. La adición de somatostatina ($1\mu M$) al medio de perfusión produjo una disminución del potencial de Ca^{2+} ; esta reducción fue de 89.048 ± 46.85 ms. En un potencial de mantenimiento de ≈ -65 mV la disminución del potencial de Ca^{2+} representó $38.698 \pm 3.87\%$ ($n = 3$). La figura 18-B muestra una neurona representativa con los efectos del péptido sobre el PA de Ca^{2+} . El pulso de corriente despolarizante se encuentra en la parte inferior. En el inserto, el diagrama de caja muestra la disminución de la amplitud del potencial restante al agregar SOM.

Control TEA+TTX	Experimental TEA+TTX+SOM	% de disminución
140.99 ± 67.51 ms	89.048 ± 46.85 ms	38.698 ± 3.87

Tabla 4. Disminución del potencial de Ca^{2+} (TEA+TTX) en presencia de Somatostatina.

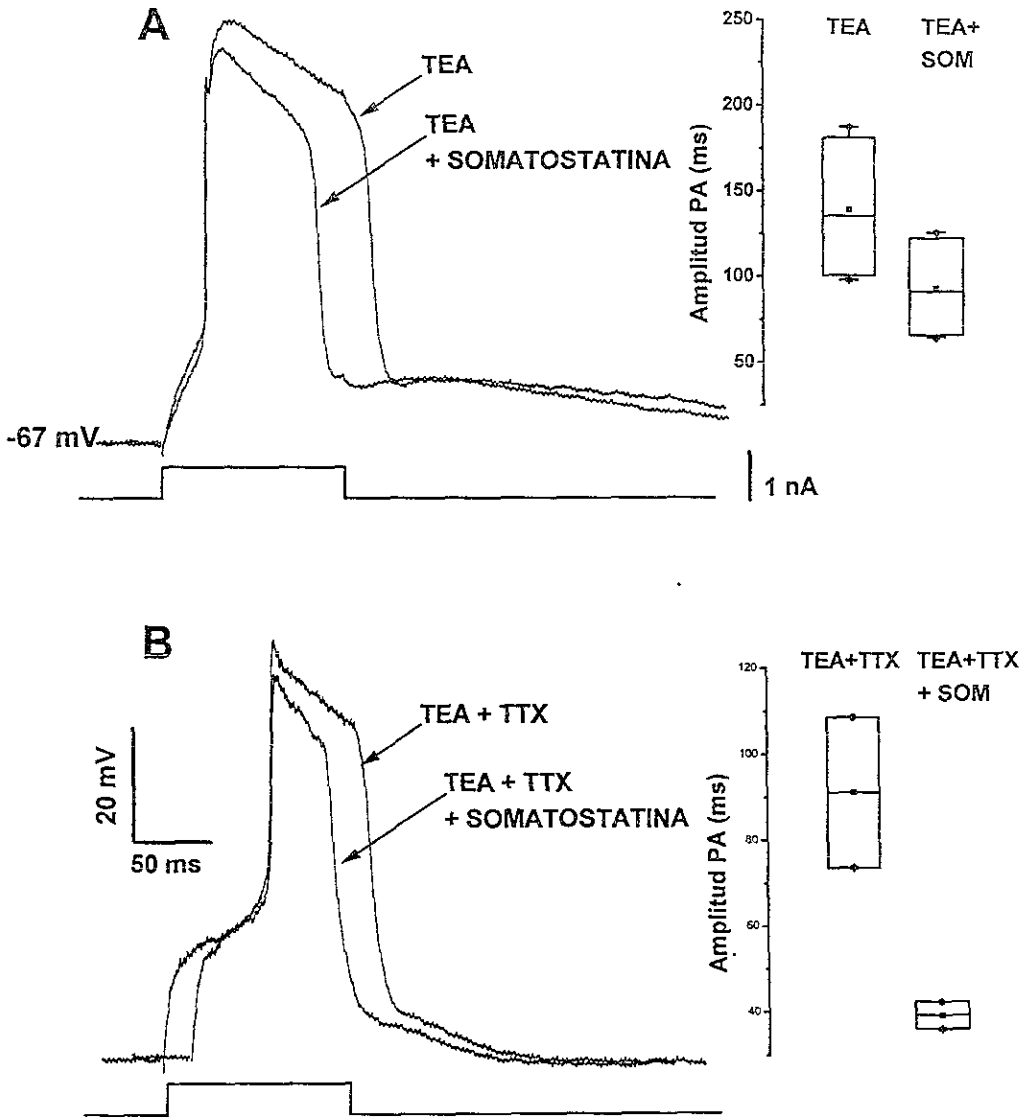


Figura 18 El Potencial de Ca^{2+} evocado en presencia de TEA 20 mM disminuye en presencia de SOM 1 μM (A) La disminución de la duración del PA esta cuantificada en el diagrama de cajas en el extremo superior derecho. Al agregar TEA 20 mM + TTX 1 μM el potencial de Ca^{2+} restante sigue siendo disminuido en presencia de SOM 1 μM (B). La duración del PA en presencia de TEA fue de 193.440 ± 53.29 ms, en presencia de TEA+SOM 1 μM 147.387 ± 47.19 ms. PA en presencia de TEA+TTX 140.99 ± 67.51 ms, en presencia de TEA+TTX+SOM 147.387 ± 47.19 ms.

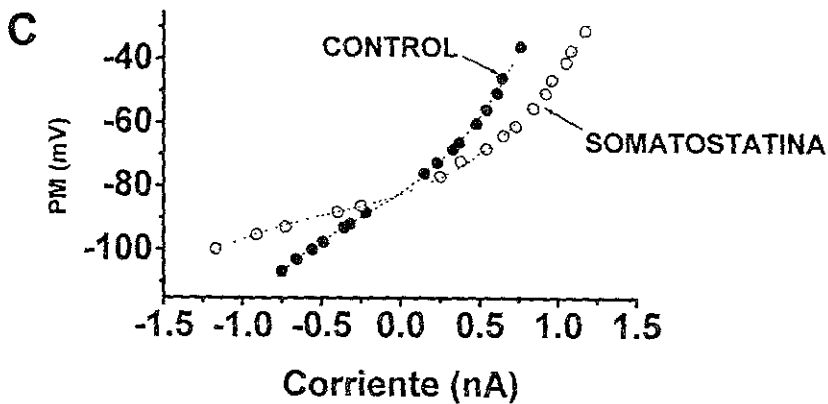
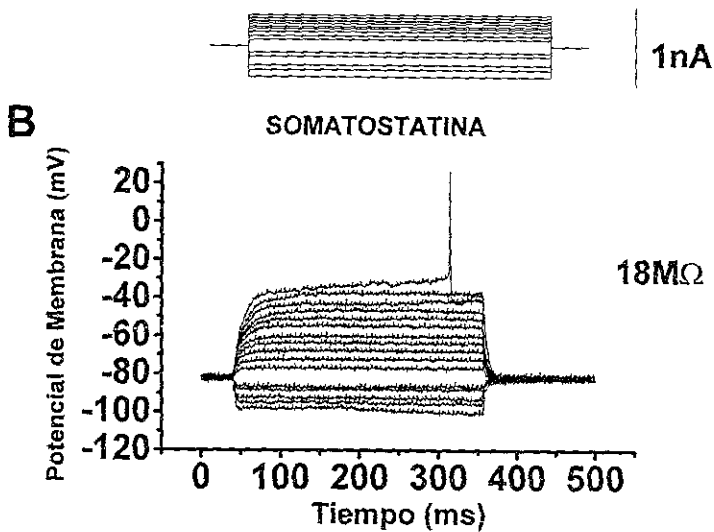
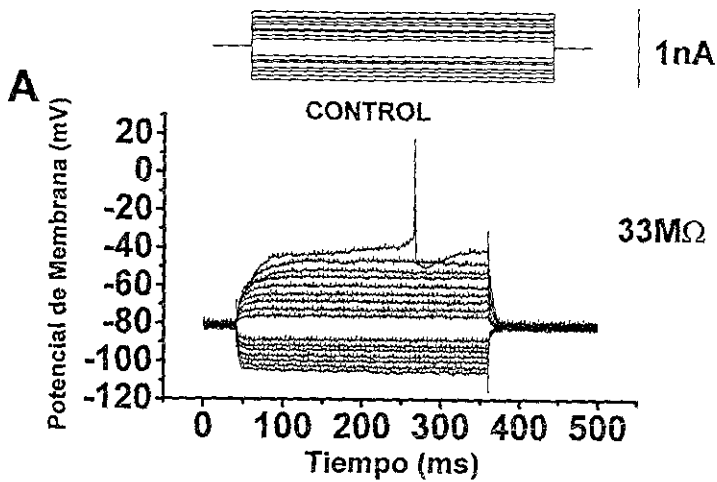
Acción de la somatostatina sobre la R_N de las neuronas estriatales de proyección

La figura 19 muestra un registro representativo de una curva I-V en condición control (A) y en presencia de somatostatina (B). En la parte superior de cada registro, los pulsos cuadrados de corriente. En 19-C se muestra la relación I-V ajustada con un polinomio de 3er orden (ver protocolos experimentales). Dicha relación muestra una disminución en la pendiente de la curva experimental acompañado por un aumento en la rectificación entrante. La disminución de la R_N es visible en presencia de somatostatina. En condición control la R_N tuvo un valor de $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$ ($n=15$); dicho resultado concuerda con lo reportado previamente (Hernández-López et al., 1997; Reyes et al., 1998). Después de la aplicación de somatostatina $1 \mu\text{M}$, la resistencia disminuye hasta $38.15 \pm 5.91 \text{ M}\Omega$. La tabla 5 muestra los resultados de los experimentos. Estos datos sugieren que el efecto principal observado de la somatostatina es postsináptico (directo sobre la neurona registrada).

R_N CONTROL	R_N SOM	% Disminución
Promedio = $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$	Promedio = $38.15 \pm 5.91 \text{ M}\Omega$	20.58 ± 5.05

Tabla 5. Valores de las R_N registradas de las neuronas espinosas medianas de proyección en condición control y en presencia de somatostatina.

Aún en presencia de TEA y de SOM la curva I-V muestra un cambio en las conductancias subumbrales. El bloqueo de las conductancias de K^+ mediante la aplicación de TEA es contrarrestada por la SOM que se encuentra actuando directamente sobre las conductancias subumbrales (Figura 20). En presencia de TEA, la resistencia presenta un incremento, tal cual ha sido reportado previamente (Reyes et al., 1998). Dicho aumento en la R_N vuelve a disminuir en presencia de SOM. ($n = 2$) y se aprecia un incremento de la rectificación entrante de la célula en la región hiperpolarizante de la curva I-V.



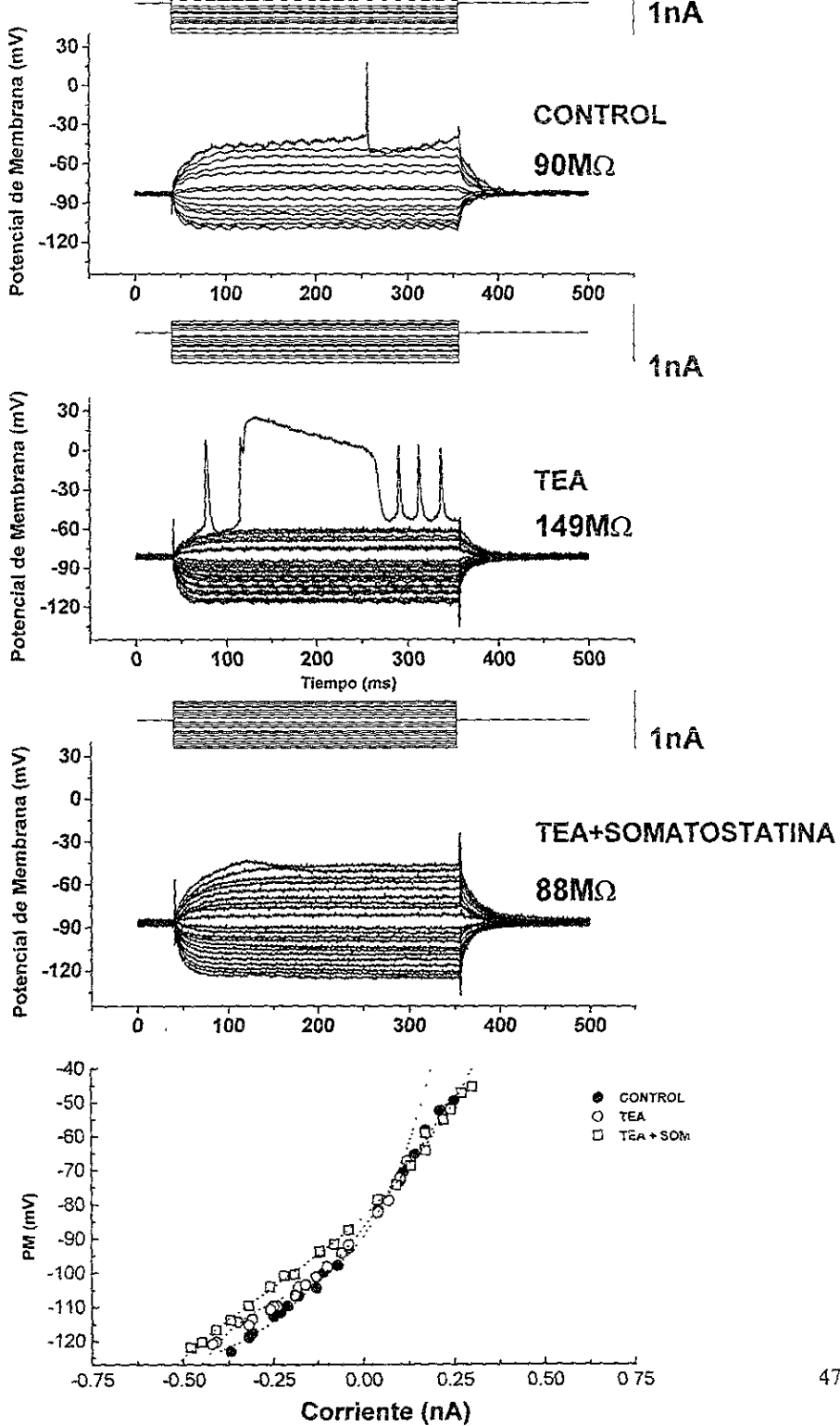


Figura 19 Efecto de la somatostatina en la Curva I/V. (A) Control y (B) Somatostatina. El incremento en la rectificación entrante en presencia de SOM se observa en la gráfica (C), donde se aprecia que las conductancias subumbrales aumentan en presencia del péptido. En términos generales, la condición control tuvo un valor promedio de $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$; en presencia de somatostatina fue de $38.15 \pm 5.91 \text{ M}\Omega$.

Figura 20. Curva I/V en presencia de TEA+SOM. (A) Curva I/V en condición control; (B) Curva en presencia de TEA 20mM; (C) Curva en presencia de TEA+SOM. Aún en presencia del bloqueador de canales de K^+ (TEA), la acción de la somatostatina favorece las conductancias subumbrales que participan en la rectificación entrante de la neurona registrada. En presencia del TEA y la somatostatina la R_N sigue disminuyendo. Los registros pertenecen a la misma célula.

Discusión

En este trabajo se presentan las primeras evidencias del efecto electrofisiológico de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante que sigue a un potencial de acción, sobre el patrón temporal de disparo; evidencias sobre la disminución de las conductancias de Ca^{2+} inducidas por somatostatina y evidencias de que la acción del péptido es directa sobre las neuronas registradas del neocórtex de la rata.

Características electrofisiológicas de las células registradas

Las características electrofisiológicas de las neuronas registradas en el presente trabajo concuerdan con las reportadas previamente para las neuronas espinosas medianas de proyección (Wilson, CJ. 1990; Galarraga *et al.*, 1994). La R_N obtenida en condición control fue de $49.51 \pm 7.88 \text{ M}\Omega$ y el potencial de reposo registrado fue de $-85 \text{ mV} \pm$; datos semejantes a los reportado previamente (Kita *et al.*, 1984, Wilson, 1990, Pineda *et al.*, 1992, Galarraga *et al.*, 1994, Flores-Hernández, 1995). La relación corriente - voltaje no lineal descrita en este trabajo ha sido reportada previamente y es debida a la presencia de una rectificación entrante, razón por la cual la resistencia de entrada incrementa su valor en estados despolarizados y disminuye en potenciales hiperpolarizados (Kita *et al.*, 1985-B; Bargas *et al.*, 1989; Galarraga *et al.*, 1994. Flores-Hernández, 1995).

En las células donde se inyectó el marcador intracelular biocitina, las neuronas reconstruidas presentaron la morfología descrita para las neuronas espinosas medianas de proyección del neocórtex de la rata, tales células mostraron las mismas características electrofisiológicas que las demás células registradas y no marcadas con biocitina; por lo que se pudo inferir que el tipo de célula registrada durante los experimentos correspondía a las neuronas espinosas de proyección.

La adaptación del disparo neuronal no es muy marcada en estas células (ver figura 10). Sin embargo la generación en la adaptación de disparo no se debe solamente a la presencia de conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} sino que también se atribuye a la participación de otras corrientes (Kita *et al.*, 1984; Pineda 1994).

Pineda y cols., (1994) demostraron que, bajo la técnica de fijación de corriente, al aplicarse un pulso de corriente supraumbral, las neuronas neocórtices generan un disparo tónico con poca

adaptación en la frecuencia de disparo (ver figura 8); Este disparo es dependiente del potencial de membrana en el que se encuentre la célula (Galarraga *et al.*, 1989). Al aplicarse un bloqueador de canales de Ca^{2+} , como lo es el Cd^{2+} , la duración del intervalo interespigas se ve disminuido y se presenta un incremento en la frecuencia de disparo; dichos resultados demostraron la importancia y presencia de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} para la generación de la frecuencia y la adaptación del disparo en estas células. La poca adaptación reportada en dicho trabajo concuerda con los datos obtenidos durante la elaboración del presente trabajo.

Acción de la Somatostatina sobre la R_N de las neuronas estriatales de proyección

La comparación de las relaciones corriente-voltaje, muestran principalmente dos fenómenos: 1) Una disminución de la R_N en presencia de somatostatina y, 2) un incremento en la rectificación entrante de la célula (fig. 19).

La acción de la somatostatina sobre la relación I-V durante los experimentos de este trabajo, sugieren una modulación de conductancias subumbrales, como lo es la de rectificación entrante (IRK). Dicha conductancia ha sido reportada previamente como un blanco de acción moduladora de la somatostatina en otras neuronas (Kreienkamp *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 1997).

Aún en las células tratadas con TEA y TTX, donde las conductancias del rectificador entrante han sido parcialmente bloqueadas (Reyes *et al.*, 1998), la somatostatina sigue teniendo una potente acción moduladora. La curva I-V (Figura 20-C) muestra que en presencia de TEA, la relación corriente - voltaje se vuelve más lineal debido al bloqueo de los canales de potasio. Sin embargo, en presencia de somatostatina, la pendiente de la curva I-V presenta una vez más, rectificación.

La disminución de la R_N conduce a la célula a un estado de menor excitabilidad guiado por el incremento en la conductancia del rectificador entrante. Dicha acción aleja a la célula del umbral de disparo neuronal, propiciando de esta manera, la acción inhibitoria que ha sido atribuida previamente a la somatostatina (Ver figura 6) (Galarraga *et al.*, 1994).

La R_N es subumbral, por consiguiente la SOM tiene efectos diferentes a nivel supra y sub umbral respectivamente.

La disminución de la R_N en presencia de somatostatina es un fenómeno que ha sido descrito previamente (Greene y Mason, 1996); dicho fenómeno también se observó durante la realización de

estos experimentos. Tal disminución de la R_N en presencia de somatostatina sugiere que este péptido actúa postsinápticamente en las neuronas de proyección del neocórtex de la rata.

Efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante

Las distintas fases que forman el postpotencial hiperpolarizante descritas previamente para las neuronas neocórtices (Pineda, 1989) fueron observadas en este estudio. El PPH presenta al menos dos componentes que pueden ser diferenciados por su curso temporal: el "rápido" (PPH_R) que alcanza su máximo entre 1 y 2 ms después de haberse originado y en el que participan canales BK y el "lento" (PPH_L) que puede durar hasta 200 ms y termina cuando la célula regresa a su estado basal, en el que participan los canales SK. Ambas conductancias BK y SK son de K^+ dependientes de Ca^{2+} .

Pese a la variabilidad en la duración de las 2 fases del PPH, estas no dejaron de ser reconocibles y fue la fase lenta (amplitud del postpotencial hiperpolarizante) mediada por la conductancia de los canales SK la que mostró de manera constante una disminución en presencia del péptido (Ver tabla 1). La variabilidad en la duración de cada una de las fases del PPH se debe a diversos factores intrínsecos y/o extrínsecos que están afectando las diferentes conductancias involucradas en la generación de este evento. En condiciones fisiológicas, el postpotencial hiperpolarizante funciona como factor limitante en la respuesta electrofisiológica neuronal fijando la frecuencia de disparo (Hernández-López *et al.*, 1996).

El PPH_L es el blanco de diferentes tipos de neuromoduladores, los cuales son los reguladores directos de la frecuencia de disparo de las neuronas (Pineda *et al.*, 1995; Sah, 1996; Hernández-López *et al.*, 1996). Con el presente trabajo se ha demostrado que la somatostatina modula principalmente la fase lenta del postpotencial hiperpolarizante (ver figura 13) disminuyendo su amplitud.

Sin embargo, la fase rápida, también presentó cierto tipo de modulación. Previamente, Duerson y cols. (1996) habían reportado la acción estimuladora de la somatostatina sobre los canales BK; sin embargo no existen trabajos que mencionen acción moduladora simultánea de la SOM sobre los canales BK y los SK.

La modulación sobre los canales BK se observó en algunas células como una acentuación de la fase rápida del PPH; dicha acentuación en el PPH_R no fue evidente en condición control (Ver figura 12 y 13).

estos experimentos. Tal disminución de la R_N en presencia de somatostatina sugiere que este péptido actúa postsinápticamente en las neuronas de proyección del neocórtex de la rata.

Efecto de la somatostatina sobre el postpotencial hiperpolarizante

Las distintas fases que forman el postpotencial hiperpolarizante descritas previamente para las neuronas neocórtices (Pineda, 1989) fueron observadas en este estudio. El PPH presenta al menos dos componentes que pueden ser diferenciados por su curso temporal: el "rápido" (PPH_R) que alcanza su máximo entre 1 y 2 ms después de haberse originado y en el que participan canales BK y el "lento" (PPH_L) que puede durar hasta 200 ms y termina cuando la célula regresa a su estado basal, en el que participan los canales SK. Ambas conductancias BK y SK son de K^+ dependientes de Ca^{2+} .

Pese a la variabilidad en la duración de las 2 fases del PPH, estas no dejaron de ser reconocibles y fue la fase lenta (amplitud del postpotencial hiperpolarizante) mediada por la conductancia de los canales SK la que mostró de manera constante una disminución en presencia del péptido (Ver tabla 1). La variabilidad en la duración de cada una de las fases del PPH se debe a diversos factores intrínsecos y/o extrínsecos que están afectando las diferentes conductancias involucradas en la generación de este evento. En condiciones fisiológicas, el postpotencial hiperpolarizante funciona como factor limitante en la respuesta electrofisiológica neuronal fijando la frecuencia de disparo (Hernández-López *et al.*, 1996).

El PPH_L es el blanco de diferentes tipos de neuromoduladores, los cuales son los reguladores directos de la frecuencia de disparo de las neuronas (Pineda *et al.*, 1995; Sah, 1996; Hernández-López *et al.*, 1996). Con el presente trabajo se ha demostrado que la somatostatina modula principalmente la fase lenta del postpotencial hiperpolarizante (ver figura 13) disminuyendo su amplitud.

Sin embargo, la fase rápida, también presentó cierto tipo de modulación. Previamente, Duerson y cols. (1996) habían reportado la acción estimuladora de la somatostatina sobre los canales BK; sin embargo no existen trabajos que mencionen acción moduladora simultánea de la SOM sobre los canales BK y los SK.

La modulación sobre los canales BK se observó en algunas células como una acentuación de la fase rápida del PPH; dicha acentuación en el PPH_R no fue evidente en condición control (Ver figura 12 y 13).

En el laboratorio, se han realizado una serie de experimentos para evidenciar la acción moduladora de la somatostatina sobre las corrientes salientes de K^+ . Dichos experimentos realizados bajo la técnica de fijación de voltaje han confirmado que la somatostatina incrementa la corriente tipo BK (datos no publicados). Combinando tales resultados con los obtenidos durante la realización de este trabajo, sugieren una modulación opuesta de la somatostatina sobre los canales BK y SK que participan en el postpotencial hiperpolarizante.

Esta posible modulación muestra a la somatostatina como un neuropéptido que puede estar actuando de manera diferencial sobre un mismo evento: el PPH, inhibiendo y aumentando sus diferentes fases simultáneamente, pues mientras estaría disminuyendo las conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} de la fase lenta (mediada por canales SK), estaría aumentando las conductancias de K^+ dependientes de Ca^{2+} (mediadas por los canales BK).

Es importante realizar una serie de experimentos en presencia de toxinas selectivas tanto de los canales BK (TEA 1-2 mM) como de los canales SK (Apamina) para determinar así, la acción del péptido en la modulación de las diferentes fases del PPH.

Efecto de la somatostatina sobre el potencial de Ca^{2+}

Trabajos previos han demostrado que la acción del TEA (20 mM) sobre las neuronas neocorticales produce un marcado aumento en la duración del potencial de acción debido al retardo de la fase de repolarización por el bloqueo de las conductancias de K^+ (Kita *et al.*, 1985-B; Galarraga *et al.*, 1989; Bargas *et al.*, 1988); dicho bloqueo permite la generación de espigas de Ca^{2+} (Hernández-López *et al.*, 1996) que son bloqueadas totalmente al añadir cadmio al medio y perdura en presencia de TTX (Galarraga *et al.*, 1989).

Para probar si la acción del péptido somatostatina sobre las neuronas espinosas medianas es disminuir, como ha sido reportado previamente en otros tipos de neuronas, la entrada de Ca^{2+} , se generaron potenciales de acción de Ca^{2+} inducidos mediante la aplicación extracelular de TEA 20 mM (Kita *et al.*, 1984; Hernández-López *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 1998) y fueron examinados en presencia del péptido (ver figura 16) después de que la acción del TEA fue estable.

La adición de somatostatina al medio de perfusión en presencia de TEA produjo una disminución de la duración del potencial de acción de Ca^{2+} . Tales resultados confirman lo previamente reportado en otras neuronas; donde se ha visto que la somatostatina produce una disminución de corrientes de Ca^{2+} (Wang *et al.*, 1990; Golard y Siegelbaum; 1993; Tallent *et al.*, 1996; Viana y Hille;

1996; Boehm y Betz; 1997). De igual manera, los resultados sugieren que el efecto de la somatostatina sobre las neuronas espinosas medianas del neocórtex de la rata es modular la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al interior de la neurona. La disminución en la entrada de Ca^{2+} altera las conductancias de potasio (SK) que dependen de este ión y que participan en la generación y mantenimiento del postpotencial hiperpolarizante.

La disminución en la entrada de Ca^{2+} debe estar siendo mediada por canales dependientes de voltaje que participan directamente en la generación de espigas y contribuyen al mantenimiento del postpotencial hiperpolarizante (Lancaster y Adams, 1986; Galarraga *et al.*, 1989; Pineda *et al.*, 1992; Sah, 1996). Esto puede explicar el efecto sobre el PPH_L (disminuyendo la conductancia a través de los canales SK dependientes de Ca^{2+}) y sugiere que el efecto de la SOM sobre el PPH_R es directo sobre canales BK.

Para descartar la posibilidad de posibles efectos presinápticos, se realizaron una serie de experimentos bajo las mismas condiciones de estimulación pero en presencia de Tetrodotoxina (TTX) (1 μ M).

De esta manera se obtuvieron evidencias directas de la acción postsináptica de la somatostatina en las neuronas neocórtices.

Previamente se ha reportado el efecto de la toxina TTX en diversas células del SNC. Dicho veneno impide la conducción del potencial de acción en nervios y músculos a través del bloqueo de los canales de Na^{+} . Los primeros estudios de fijación de voltaje en presencia de TTX demostraron la eficiencia de dicha toxina en bloquear la I_{Na} selectivamente, dejando la I_K intacta (Naharashi *et al.*, en Hille, 1992). La aplicación de la TTX bloquea completamente los canales de Na^{+} impidiendo así, la generación de potenciales de acción rápidos; sin embargo, la inyección de corriente intracelular cuando las células han sido sometidas a un tratamiento con TEA + TTX permite seguir obteniendo potenciales de acción lentos (Kita *et al.*, 1985) con un componente casi exclusivamente de Ca^{2+} y canales repolarizantes de K^{+} insensibles al TEA. Sin embargo, la aplicación de TTX no solo bloquea de manera eficiente los canales de Na^{+} . Dicha toxina es un potente inhibidor de los circuitos sinápticos neuronales. En presencia de TTX toda actividad sináptica queda suprimida; bajo estas condiciones es posible realizar un registro exclusivamente postsináptico.

Así, en los experimentos realizados en presencia de TEA + TTX + SOM el potencial de acción lento registrado continua presentando una disminución en su duración de aproximadamente 38.69 ± 3.87 % del valor control. Dichos resultados sugieren que la disminución en la duración del potencial de

Ca^{2+} observada durante los experimentos realizados para este trabajo es consecuencia directa de la activación de los receptores de SOM en las neuronas espinosas medianas registradas y no un efecto indirecto sobre la liberación de otros neurotransmisores.

En resumen, los resultados obtenidos sobre la R_N y el postpotencial hiperpolarizante, indican que la somatostatina probablemente se encuentre modulando, distintas conductancias:

- a) Aumentando la conductancia del rectificador entrante de K^+ (IRK a nivel subumbral),
- b) Disminuyendo la entrada de Ca^{2+} ,
- c) Modulando diferencialmente los canales BK y SK:
 - Aumentando la conductancia a través de los BK directamente
 - Disminuyendo la conductancia de los SK al disminuir la entrada de Ca^{2+}

Bajo estas condiciones, surge la siguiente pregunta: ¿Qué efecto tiene dicha modulación sobre la frecuencia temporal de disparo de las neuronas espinosas de proyección?

Acción de la somatostatina sobre el patrón temporal de disparo de las neuronas de proyección

Los resultados de este trabajo muestran el efecto de la somatostatina sobre el PPH que sigue al potencial de acción. Tal efecto sugiere que la alteración del PPH modifica la frecuencia de disparo, lo cual debe reflejarse durante la generación de un tren de potenciales de acción.

Durante los experimentos realizados con los trenes de PA's y curvas I/F se observó un incremento en la frecuencia de disparo (ver figura 13 y 14) mediado por la disminución del postpotencial hiperpolarizante.

El incremento registrado en la frecuencia de disparo por la aplicación de somatostatina es un efecto probablemente debido a la disminución de la entrada de Ca^{2+} a las células (Galarraga *et al.*, 1989; Pineda *et al.*, 1992). Por otra parte, trabajos previos han mostrado que este péptido disminuye la entrada de Ca^{2+} a las células a través de la activación de sus diferentes receptores (Ver figura 5). Estos dos fenómenos sugieren que el incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas neocorticales al aplicarse somatostatina se debe a la activación de receptores de SOM que inhiben la entrada de Ca^{2+} y

que participen directamente en la disminución del PPH_L generando así, un incremento en la frecuencia del disparo repetitivo.

Acompañando al incremento en la frecuencia de disparo, se registró un fenómeno de irregularidad en el disparo neuronal. Durante la realización de los experimentos de tren de disparo, la irregularidad fue una característica presente en algunas de las células sometidas a este protocolo experimental. La irregularidad en el disparo se presentó en forma de oscilaciones membranales en lugar del disparo repetitivo generando ráfagas de PA's (ver fig. 17). Este disparo podrían deberse a la modulación diferencial de las dos fases del postpotencial hiperpolarizante. Parte de esa modulación diferencial del PPH podría deberse a la activación de las conductancias de los canales BK estimuladas por somatostatina. La posible doble acción moduladora del péptido explica en parte esta acción inhibitoria del PPH y excitatoria sobre el patrón temporal de disparo.

En los primeros potenciales de acción de un tren de disparo, la fase rápida pudo ser observada más que en la parte final del tren (ver fig. 14). En el caso de la fase lenta, la mayor modulación se presentó en los últimos PA's del mismo tren de disparo. Esta doble modulación podría estar explicando esta tendencia a la adaptación del disparo que se reflejaría como oscilaciones en lugar de PA's. El posible bloqueo de las conductancias de los canales SK de la fase lenta del PPH, pueden ser una causa de la pérdida del disparo repetitivo de las células registradas. De igual manera el incremento en la conductancia de los canales BK podría estar contribuyendo directamente en la generación de las ráfagas de PA's y juntando ambos efectos, la irregularidad del disparo podría ser consecuencia de la pérdida del equilibrio de las conductancias del PPH, incrementándose la BK y disminuyendo notoriamente la SK. Es importante destacar que la irregularidad en el disparo se presentó como ráfagas de alta frecuencia de disparo acompañadas por periodos largos de adaptación sin disparo (ver fig. 15 y 17)

Desde el inicio del presente trabajo se contempló la posibilidad de que el efecto de la somatostatina sobre las neuronas espinosas medianas del neocórtex fuera de origen presináptico. De hecho, mucha de la bibliografía consultada hace énfasis en que la somatostatina actúa a través de receptores localizados presinápticamente (Scanziani *et al.*, 1992; Scholz y Miller, 1992; Scharfman, 1993; Gardette *et al.*, 1995; Trudeau *et al.*, 1996; Boehm y Betz, 1997). Sin embargo, en el laboratorio se ha descartado un posible sitio de acción en terminales presinápticas para los receptores de SOM y están por realizarse una serie de experimentos que permitan identificar si la somatostatina modula directamente otras terminales sinápticas.

Es importante recalcar que los experimentos realizados en el laboratorio en neuronas disociadas bajo la técnica de fijación de voltaje han permitido confirmar dos acciones de la somatostatina: 1) el aumento en la corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} de los canales BK y 2) una disminución de la corriente de Calcio. Bajo esta técnica, se permite el registro directo de las diferentes corrientes que participan en los procesos de excitabilidad neuronal sin las aferentes al núcleo. Es importante mencionar que los resultados obtenidos tanto en fijación de voltaje, como lo obtenido en fijación de corriente presentan gran similitud.

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran una modulación diferencial del péptido somatostatina sobre las neuronas espinosas medianas del neocórtex de la rata. Sin embargo, qué tipo de receptores de somatostatina participan en la modulación, sigue sin conocerse.

Los futuros experimentos a realizarse deben estar dirigidos para determinar las posibles vías de señalización que el péptido puede estar siguiendo en el neocórtex para identificar los diferentes receptores involucrados (ver introducción)

Bibliografía

Araujo, D., Lepchak, P.A., Collier, B. and Quirion, R. (1990) Evidence that somatostatin endogenous acetylcholine release in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 55: 1546-1555.

Bargas, J., Galarraga, E. and Aceves, J. (1988) An early outward conductance modulates the latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain Res.* 75: 146-156.

Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y. and Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *Journal of Neuroscience*. 14(11):6667-6686.

Bargas, J., Galarraga, E. and Surmeier, D.J. (1993). Neuronal Networks of the Mammalian Brain Have Functionally Different Classes of Neurons: Suggestions for a taxonomy of membrane ion conductances.

Bell, G.I. and Terry Reisine. (1993). Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends in Neurosciences*. Vol. 16, No. 1, pp 34-38.

Bennet, B.D. and J.P. Bolam (1993) Characterization of calretinin-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain Res.* 610: 305-310.

Berridge, M (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* (361), 315-325.

Boehm, S. and Hucks, S. (1996) A somatostatin receptor inhibits noradrenaline release from chick sympathetic neurons through pertussis toxin sensitive mechanisms: comparison with the action of alpha2-adrenoceptors. *Neuroscience* 73: 595-604

Boehm, S. and Betz, H. (1997). Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *Journal of Neuroscience*. 17(11):4066-4075.

Brakch, N., Galanopoulou, A.S., Patel, Y., Boileau, G., and Seidah, N.G. (1995) Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS lett.* 362, 143-146.

Brezeau, P., Vale, W., Burgs, R., Ling, N., Butcher, M, Rivier, J. and Guillermin, R. (1972). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, Vol. 179 pp 77-79.

Brown, A.M., and Birnbaumer L (1990) Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu Rev. Physiol.* 52: 197-213.

Brownstein, M, Arimura, Sato, H., Schalli, A. (1975) *Pharmac. Biochem Behav.* 2, 693-696

Bruno, J. F., Y. Xu, J. Song, and Berelowitz, M. (1992) Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11151-11155.

Buscali, L., Esteve, J.P., Saint-Laurent, N., Bertrand, V., Reisine, T., O'carrol, A.M. Bell, G.I. Schalli, V., Vaysse, I., and Susini. C. (1995). Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analoge RC-160 is mediated by SSTR2 and SSTR5 somatostatin receptor subtypes through different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 279-284.

Chesselet, M.-F. and Reisine T. (1983) Somatostatin regulates dopamine release in rat striatal slices and cat caudate nuclei. *J. Neurosci.* 3, 232-236.

Chesselet, M.F., and Graybiel, A.M. (1986). Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* Vol. 17, No. 3, pp. 547-571

Desban, M., Gauchy, C., Kernel, M.L., Besson, M.J. and Glowinski, J. (1989) Three-dimensional organization of the striosome compartment and patchy distribution of striatonigral projections in the matrix of the cat caudate nucleus. *Neuroscience* 29: 551-566.

Dodd, J. and Kelly J. (1978). Is Somatostatin an excitatory transmitter in the hippocampus?. *Nature*, 273; 674-675.

Dournaud, P., Boudin, H., Schonbrunn, A., Tannebaum, G.S., and Beaudet, A. (1998). Interrelationship Between Somatostatin sst2A Receptors and Somatostatin-Containing Axons in Rat Brain: Evidence for Regulation of Cell surface Receptors by endogenous Somatostatin. *Journal of Neuroscience*, 18(3): 1056-1071.

Dubé, L., Smith, A.D., and Bolam, J.L. (1988) Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origins in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 267:455-471.

Duerson, K., White R.E., Jiang, F., Schonbunn, A., and Armstrong D.L. (1996). Somatostatin stimulates BK_{Ca} Channels in rat pituitary tumor cells through lipoxigenase metabolites of arachidonic acid. *Neuropharmacology*, Vol. 35, No, 7, pp 949-961.

Esch, F., Böhen, P., Ling, N., Benoit, R., Brezau, P. and Guilermin, R. (1980). Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and somatostatin-25. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 77, No. 11, pp 6827-6831.

Figaredo-Cardenas, G., Morello, G., Sancesario, E., Bernardi, G., and Reiner, A. (1996). Colocalization of Somatostatin, Neuropeptide Y, Neuronal Nitric Oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rat. *Brain Reseach* 735 317-324.

Flores-Hernández, J., Galarraga, E., Bargas, J. (1994) Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J. Neurophysiol.* 72: 2246-2256.

Fontana, G., De Bernardi, R., Ferro, F., Gemignani, A. and Raiteri, M. (1996) Characterization of the glutamate receptors mediating release of somatostatin from cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem* 66: 161-168.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Fujii, Y., Gonoi, T., Yamada, Y., Chihara, T., Inagaki, N. and Seino, R. (1994) Somatostatin receptor SSTR2 mediates the inhibition of high-voltage-activated calcium channels by somatostatin and its analogue SMS201—995. *FEBS letters* 355: 117-120.
- Galarraga, E., Bargas, J., Sierra, A. and Aceves, J. (1989). The Role of Calcium in the firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* 75: 157-168.
- Galarraga, E., Pacheco-Cano, M.T., Flores-Hernández, J.V., Bargas, J. (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp. Brain Res.* 100:239-249.
- Galván, E., Bargas, J., Galarraga, E. (1998) Acción Moduladora de la Somatostatina sobre las Neuronas de Proyección del Neostriado. XLI. CNCF.
- Gardette, R., Faivre-Baumman, A., Kordon, L.C. and Epelbaum, J. (1995) Modulation by Somatostatin of Glutamate Sensitivity During development of mouse hypothalamic neurons in vitro. *Dev. Brain Res.* 86: 123-133
- Garret, A. E., and Crutcher, M. D. (1994). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences.* Vol 13, No. 7 pp 266-271.
- Garside, S., and Mazurek, M. F. (1997). Role of Glutamate Receptors Subtypes in the Differential Release of Somatostatin, Neuropeptide Y, and Substance P in Primary Serum-Free Cultures of Striatal Neurons. *Synapse* 27: 161-167.
- Gerfen, C. R., Herkenham, M. and Thibault, J. (1987) *The Journal of Neuroscience.* 7, 3915-3943.
- Gillies, G. (1997). Somatostatin: the neuroendocrine story. *Trends in Pharmacology.* March 1997. Vol 18. 87-95
- Gimenez-Amaya, M.J. and Graybiel, A.M. (1990) Compartmental origins of the striatopallidal projections in the primate. *Neuroscience* 34: 111-126.
- Golard, A. and Siegelbaum, S.A. (1993). Kinetic basis for the Voltage-dependent inhibition of N-type Calcium Current by Somatostatin and Norepinephrine in Chick Sympathetic Neurons. *The Journal of Neuroscience,* September 13(9): 3884-3894.
- Goodman, R.H., Aron, D. C. and Ross, B. A. (1983) Rat pre-prosomatostatin: structure and processing by microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258, 5570-5573.
- Graybiel, A.M. (1994). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia *Trends in Neurosciences.* Vol 13, No. 7 pp 244-253.
- Greene, J.R. and Manson, A.. (1996). Effects of Somatostatin and related peptides on the membrane potential and input resistance of Rat Ventral Subicular Neurons, in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* 276: 426-432.
- Gudermann, T., Schöneberg, T. and Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-Protein-coupled receptors. *An. Rev. Neurosci.* 1997. 20:399-427.

Hathway, G.J., Emson, P.C., Humphrey, P. and Kendrick, K.M. (1998). Somatostatin Potently Stimulates In Vitro Striatal Dopamine and γ -Aminobutyric Acid Release by a Glutamate-Dependent Action. *Journal of Neurochemistry*. 70, 1740-1749.

Hernández-López S., Bargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A. and Galarraga, E. (1997). D1 Receptor Activation Enhances Evoked Discharge in Neostriatal Medium Spiny Neurons by Modulating an L-Type Ca^{2+} Conductance. *The Journal of Neuroscience*. May 1, 17(9):3334-3342.

Hernández-López, S., Bargas, J., Reyes, A. and Galarraga, E. (1996). Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *NeuroReport* 7, 454-456.

Hille, B. (1992) *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. (Ed: Sinauer Associates Inc.) Sunderland, Mass. U.S.A.

Holloway, S., Feniuk, W., Kidd, E.J. and Humphrey, P.A. (1996). A Quantitative Autoradiographical Study on the Distribution of Somatostatin SST2 Receptors in the Rat Central Nervous System using [¹²⁵I]-BIM-23027. *Neuropharmacology*, Vol. 35, No. 8 1109 - 1120.

Hoyer, D., Bell, G.I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.A., A-M O'Carroll, Patel, Y.C., Schonbrunn, A., Taylor, J.E. and Reisine, T. (1995). Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *TIPS* - March 1995. (Vol. 16) pp. 86-88.

Ikeda, S., and Schofield, G. (1989) Somatostatin blocks a Ca^{2+} current in rat sympathetic ganglion neurons. *J. Physiol. Lond.* 409: 221-240.

Inoue, M., and Mistunobu Yoshii. 1992. Modulation of ion channels by somatostatin and acetylcholine. *Progress in Neurobiology*. Vol 38, pp. 203 to 230.

Ishibashi H. and Akaike, N. (1995). Somatostatin modulates High-Voltage-Activated Ca^{2+} channels in freshly dissociated rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*. Vol 74, No. 3. September 1028-1036.

Johansson, O., Hökfelt, T. and Elde, R. (1984) Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of adult rat. *Neuroscience* 13, 265-339.

Kawaguchi, Y. C.J. Wilson and Piers C. Emson. Projection Subtypes of Rat Neostriatal Matrix Cells Revealed by Intracellular injection of Bocytin.(1990). *The Journal of Neuroscience*, October 10(10): 3421-3448.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.A. and Emson, P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neuroscience*. Vol. 18, 527-535.

Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, Morphological, and Histochemical Characterization of Three Classes of interneurons in Rat Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, November 13(11) 4908-4923.

Kawaguchi, Y. and Kubota, Y. (1994). Local circuit neurons in the frontal cortex and the neostriatum. 73-88. *En Functions of the cortico-basal ganglia loop*.

- Kita, H., Kita, T. and Kitai, S.T. (1984). Passive Electrical Membrane Properties of Rat Neostriatal Neurons in an in vitro Slice Preparation. *Exp. Brain Res.* 300: 129-139.
- Kita, H., Kita, T. and Kitai, S.T. (1985). Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Exp. Brain Res.* 60: 54-62.
- Kita, H., Kita, T. and Kitai, S.T. (1985-B). Regenerative potentials in rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Exp. Brain Res* 60: 63-70
- Kleuss, C., Scherubel, H., Hescheler, J., Schultz, J. and Witting, B. (1991) Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature Lond.* 353: 43-48
- Kleuss, C., Scherubel, H., Hescheler, J., Schultz, J. and Witting, B. (1992) Different β -Subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature Lond.* 358: 424-426.
- Kleuss, C., J. Hescheler, C. Ewel W. Rosenthal, G. Schultz, and B. Wittig. (1991) Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature Lond.* 353: 43-48
- Kreienkamp, H.-J., Hönck, H. and Richter, D. (1997). Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1). *FEBS Letters* 419: 92-94.
- Krulich, L., Dhariwal, A.P.S. and McCann, S.M. (1968). Stimulatory and Inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from pituitary in vitro. (1968). *Endocrinology* 83:783-790.
- Kumatsuzaki, K., Murayama, Y., Giambarella, U., Ogata, E., Seino, S., and Nishimoto, I. (1997). A novel system that reports the G-proteins linked to a given receptor: a study of type 3 somatostatin receptor. *FEBS letters* 406, 165-170.
- Lancaster, B. and Adams, J. (1986) Calcium dependent current generating the afterhyperpolarization in hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology.* 55(6) 1268-1286.
- Lewis, L.D., Weight, F.F. and Luini, A. (1986) A guanine-nucleotide binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium currents by somatostatin in a pituitary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83, 9035-9039.
- Martin, J.-L., Chesselet, M.-F., Raynor, K., Gonzales, C. and Reisine, T. (1991). Differential distribution of somatostatin receptor subtypes in rat brain revealed by newly developed somatostatin analogs. *Neuroscience.* Vol 41, No. 2/3, pp. 581-593.
- Mathe, A.A., Nomikos, G.C. and Svensson, T.H. (1993) In vitro release of somatostatin from rat hippocampus and striatum. *Neurosci. Lett.* 149: 201-204.
- Moore, S.D., Madamba, S., Joëls, M., and Siggins, G.R. (1987). Somatostatin Augments the M-Current in Hippocampal Neurons. *Science.* Vol. 239. 278-280.
- Murphy, T.H., Worley, P.F., Baraban, J.M. (1991) L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7: 625-535.

- Nouel, D., Gaudriault, G., Houle, M., Reisine, T., Vincent, J-P., Mazella, J. and Beaudet, A. (1997). Differential Internalization of Somatostatin in COS-7 Cells Transfected with SST1 and SST2 Receptor Subtypes: A confocal Microscopic Study Using Novel Fluorescent Somatostatin Derivatives. *Endocrinology* 138: 296-306.
- O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., Koning, M. and Mahan, L. (1992) Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol. Pharmacol.* 42, 939-946.
- Parent, A. (1994). Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*. Vol 13, No. 7 pp 254-258.
- Patel, Y.C., Galanopoulou, A.S., Rabbani, S.N., Jun-Li Liu., Ravazzola, M., and Amherdt, M. (1997). Somatostatin-14, somatostatin-28 and prosomatostatin are independently and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islets somatostatin tumor cells (1027B₂). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 131: 183-194.
- Pineda Cortes, J.C. (1989) Estudio sobre el postpotencial hiperpolarizante y la repolarización del potencial de acción en las neuronas neoesriatales. Tesis Maestría. CINVESTAV, IPN.
- Pineda, J.C., Galarraga, E., Bargas, J., Cristancho, M. and Acevez, J. (1992). Charybdotoxin and Apamine Sensivity of the Calcium-Dependent Repolarization and the Afterhyperpolarization in Neoesriatal Neurons. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 68, No. 1, July. 287-293
- Pineda, J.C., Bargas, J., Flores-Hernández, J. and Galarraga, E. (1995). Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neoesriatal neurons. *European Journal of Pharmacology* (281) 271-277.
- Pittman Q.J. and Siggins, G.R. (1981) Somatostatin hyperpolarizes hippocampal pyramidal cells in vitro. *Brain Res.* 221: 402-408.
- Piwko, C., Silke, V., Thoss, E. Schüpbach, J. Kummer, D., Langenegger, A., Probst, D.E. and Hoyer, D. (1996). Pharmacological characterisation of human cerebral cortex somatostatin SRIF₁ and SRIF₂ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 355: 161-167.
- Pradayrol, L., Jörnvall, H., Mutt, V. and Ribet, A. (1980). N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *Febs Letters*. Volume 109, number 1. 55-58.
- Puebla, L., and Arilla, E. (1996). Involvement of presynaptic histamine H₃ receptors in the modulation of somatostatin binding and its effects on Adenylil Cyclase activity in the rat frontoparietal cortex. *Journal of Neurochemistry*. 66, 1051-1059.
- Ragsdale, C. W. and Graybiel, A.M. (1990) A simple ordering of neocortical areas established by the compartmental organization of their striatal projections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6196-6199.
- Rajakumar, N., Elisevich, K. and Flumerfelt, B.A. (1993). Compartamental origin of the Striato-Entopeduncular projection in the rat. *The journal of Comparative Neurology*. 331:286-296.

Raynor, K., Murphy, W., Coy, D., Taylor, J., Moreau, J.P., Yasuda, K., Bell, G.I. and Reisine, T. (1992) Cloned somatostatin receptors: identification of subtypes selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides. *Mol. Pharmacol.* 43, 838-844.

Reisine, T. (1995). Somatostatin receptors. *Am. J. Physiol.* 269 (Gastrointest. Liver Physiol. 32): G813-G820.

Rens-Domiano, S. and Reisine, T. (1991) Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 17885-17897.

Reyes, A., Galarraga, E., Flores-Hernández, J., Tapia, D. and Bargas, J. (1998). Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp. Brain Res.* 120:70-84.

Rodríguez-Sánchez, M.N., Puebla, L., López-Sañudo, S., Rodríguez-Martín, E., Martín-Espinosa, M.S., Rodríguez-Pena, M.G., Arilla, E. (1997). Dopamine Enhances Somatostatin Receptor-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase in Rat Striatum and Hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* 48:238-248.

Roth, E., Kreienkamp, H.J., Nehring, R.B., Roosterman, D., Meyerhof, W. and Richter, D. (1997). Endocytosis of the Rat Somatostatin Receptors: Subtype Discrimination, Ligand Specificity, and Delineation of Carboxy-Terminal Positive and Negative Sequence Motif. *DNA and Cell Biology*. Vol. 16, Number 1, 111-119.

Rushlow, W., Naus, C.C.G. and Flumerfelt, B.A. (1994). Colocalization of prosomatostatin-derived peptides in the Caudate-Putamen of the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* 349: 583-595.

Rushlow, W., C.C.G. Naus, and B.A. Flumerfelt. (1996). Somatostatin and the patch/matrix compartments of the rat caudate-putamen. *The Journal of Comparative Neurology.* 364: 184-190.

Sah, Pankaj. (1996). Ca^{2+} activated K^{+} currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends in Neurosciences*. Vol. 19, No. 4., 150-154.

Scanziani, M., and Campogna, M. (1992) presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9: 919-927.

Scharfman, H.E. (1993). Presynaptic and postsynaptic actions of somatostatin in area CA1 and the dentate gyrus of rat and rabbit hippocampal slices. En: *Presynaptic Receptors in the Mammalian Brain*. Thomas V. Dunwiddie and David M. Lovinger, Editors. 1993 Birkhäuser Boston.

Schindler, M., Humphrey, P. and Emson, P.C. 1996. Somatostatin receptors in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, Vol. 50. 9 - 47.

Scholz, KP and Miller, R.J. (1992) Inhibition of Quantal Transmitter Release in the Absence of Ca^{2+} Influx by a G- Protein Linked Adenosine Receptor at Hippocampal Synapsis. *Neuron* 8: 1139-1150.

Schweitzer, P., Mandamba, S.G. and Siggins, G.R. (1998). Somatostatin increases a voltage-insensitive K^{+} conductance in rat CA1 hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, May 13(5): 2033-2049.

Seida, N.G. (1993). The Mammalian prohormones convertases. *J. Neurochem.* 61, 53-55.

Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewick, M., Mbikay, M. and Chretien, M. (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and Furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA* 9, 415-424.

Tallent, M., Liapakis, G., O'Carroll, A.M., Lolait, S.J., Dichter, M. and Reisine, T. (1996). Somatostatin receptors subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-Type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience*. Vol. 71, No. 4, pp. 1073-1081.

Tallent, M., and Siggins, G.R. (1997). Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 78: 3008-3018.

Tentler, J., Hadcock, J. and Gutierrez-Hartmann, A. (1997). Somatostatin Acts by Inhibiting the Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate (cAMP)/Protein Kinase A Pathway, cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) Phosphorylation, and CREB Transcription Potency. *Molecular Endocrinology* 11: 859-866.

Thermos, K., Radke, J., Kastellakis, A., Anagnostakis, Y. and Spyrali, C. (1996). Dopamine-Somatostatin Interactions in the Rat Striatum: An In Vitro Microdialysis Study. *Synapse* 22:209-216.

Trudeau, L., Doyle, R.T., Emery, D.G. and Haydon, P. (1996) Calcium independent activation of the secretory apparatus by ruthenium red in hippocampal neurons: a new tool to assess modulation of presynaptic function. *Journal of Neuroscience*, 16: 46-54.

Twery, M.J. and Gallagher, Noel. (1989) Somatostatin hyperpolarizes neurons and inhibits spontaneous activity in the rat dorsolateral septal nucleus. *Brain Res*. 497: 315-324.

Twery, M.J. Wong, L.A., Gallagher, Noel. (1991) Somatostatin induced hyperpolarization of septal neurons is not blocked by pertussis toxin. *Eur. J. Pharmacol*. 192: 287-291.

Vale, W.W., River, C., and Brown, M. (1977). Regulatory peptides of the hypothalamus. *Ann. Rev. Physiol*. 38, 473-527.

Viana, F. and Hille, B. (1996). Modulation of High Voltage-Activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience*, October 1, 16(19):6000-6011.

Vuillet, J. *Neuroscience* 46, 351-360.

Wang, H.-L., Reisine, T. and Dichter, M. (1990) Somatostatin-14 and somatostatin-28 inhibit calcium currents in rat neocortical neurons. *Neuroscience*. 38, 335-342.

White, M. G., Crumling, M.A. and Meriney, S.D. (1997) Developmental changes in calcium current pharmacology and somatostatin inhibition in chick parasympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience*, August 15. 17(16):6302-6313.

Wilson, C.J. (1998) *The Basal Ganglia: The Synaptic Organization of the Brain* 4th ed. (Ed: Shepherd GM) Oxford UP., New York, pp 329-375.

Wilson, C.J. Chang, H.T. and Kitai, S.T. (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J. of Neuroscience*, Vol 10, 508-519.

Wilson, C.J. The generative of natural firing patterns in neostriatal neurons. (1993) *Progress in Brain Research*, Vol. 99. 277-297.

Wilson, C.J., Chang, H.T. and Kitai, S.T. (1983) Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neurons in the rat. *Exp. Brain Res.* 51- 227-235.

Yasuda, K., Rens-Domiano, S., Breder, S., Law, C.D., Saper, C., Reisine, T. And Bell, G.I. (1992) Cloning of a novel somatostatin receptor SSTR3, coupled to adenynyl ciclase. *J. Biol. Chem.* 267, 20422-20428.