

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores

Iztacala

**Identificación de los Canales de Potasio Presentes en las
Terminales Glutamatérgicas de la Sinapsis Cortico-
Estriatal de la Rata.**

TESIS

Que para obtener el título de

Bióloga

Presenta:

Xóchitl José Angeles

Director de Tesis: **Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero**

Tlalneplantla, Edo de México

2005



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.

*Me fui a los bosques,
Por que quería vivir con intención,
Quería probar la savia de la vida,
Para desterrar todo lo que no era vida
Para que no al morir,
Comprender que no había vivido.*

Thoreau

Agradecimientos

A Mis Padres: Leonardo José Bautista, Florina Angeles Trejo

Por el gran amor y cariño que me han dado, por el gran apoyo otorgado, por la confianza depositada en mi, por todas las experiencias que hemos pasado y vivido juntos, por lo que hemos logrado juntos, por todos sus consejos para que fuera mejor persona, por todas sus enseñanzas, por ser como son, por ser mis papás.

“Si cultivas tu talento cuando joven, vendrán tiempos que te alegres en extremo; más si desprecias los estudios serás necio e infeliz cuando viejo”. J Manrique.

A Mi Hermana: Alejandra José Angeles

Por haber sido el regalo más maravilloso del mundo que pude haber recibido, por el día que apareciste en mi vida, porque sin ti mi vida estaría vacía, por escucharme y darme consejos de toda índole, por apoyarme en las decisiones que he tenido que tomar, por haber sido y por ser mi más fiel amiga y compañera.

“Si una montaña se interpone en tu camino, codéala. Si no puedes rodearla, pasa por encima; si no puedes pasar por encima, detente y pregúntate si vale la pena llegar al otro lado. En caso afirmativo, cava un túnel.”.

Anónimo

A Mis Abuelitos Manuela Bautista, Alejandro José

Por el gran cariño que me dieron y me han dado, por su confianza, por su apoyo, por los cuidados que me dieron cuando más lo necesite.

“La naturaleza no hace nada en vano”. Aristóteles

A Mis Abuelitos Delfina Angeles*, León Angeles*

Por el gran cariño que me dieron, por los cuidados que me dieron, aunque casi no los frecuente.

“Dios es sofisticado, pero no malévol”. Alebert Einstein

A Mis Tíos

Quiero agradecerles el apoyo que me otorgaron cuando más lo necesite, en especial a Mi Tía Dominga Carrillo y Fortino José, Lourdes José y Juan José.

“Las inteligencias grandes discuten las ideas, las inteligencias medias los sucesos,; y las pequeñas las persona.” Anonimo

A Soledad Ramírez Barcenas y Familia.

Por su gran apoyo otorgado, por la confianza depositada en alguien extraño a su familia, por su gran amistad, por los consejos que algún día me dio, Gracias por haber estado en el tiempo adecuado a la hora adecuada.

“Los pies en la tierra y el corazón y la mente en el cielo, nunca todo en el mismo lugar.” Victor Díaz Guerrero

A Mis Amigos: Gaby, Leo, Luis, Lupita, Daniela, Luz, Karla.

Gracias por haber compartido un breve tiempo de nuestras vidas en la carrera, de ustedes aprendí muchas cosas, fueron y han sido mi apoyo, por haber compartido con ustedes alegrías y tristezas, y por todo lo que vivimos juntos durante la carrera. Nunca los olvidare. Los Quiero Mucho.

"Cuando no comprendemos una cosa, es preciso declararla absurda o superior a nuestra inteligencia, y generalmente se adopta la primera determinación".Concepcion Arenal

A Alberto Villalobos Cámara

Por haber cambiado mi forma de ver la vida radicalmente, por todo lo que hemos vivido juntos, por ser un gran amigo y compañero, por escucharme, comprenderme y apoyarme en las decisiones que he tenido que tomar, por que sin tu amistad mi vida seria otra, por ser quien eres. TQM..

"Piensa en amor, cuando sientas tristeza; piensa en Dios, cuando no tengas esperanza; piensa en ti, cuando no tengas amigos, piensa en el pasado cuando no tengas futuro" Anónimo

Director de Tesis:

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero

Quiero expresar mi más grande y profundo agradecimiento a la persona, que sin conocerme me acepto en su laboratorio, me dio consejos, me impulso para que siguiera creciendo como persona, me apoyo en los momentos difíciles, me ilustró con su sabiduría y experiencia, y fue un gran amigo y compañero de laboratorio:

A los sinodales por los consejos que me dieron para enriquecer este trabajo, y por el tiempo que me dedicaron para la revisión del mismo:

Dra. Berta Segura Alegría.

Biól. Hugo Jesús Castro Cortés.

M en C. Javier Alonso Trujillo.

M en C Alfonso Reyes Olivera

A todos aquellos profesores que me impulsaron para que terminara la carrera. Cada uno de ustedes apporto su granito de arena para que este proyecto llegara a su conclusión; de ustedes aprendí muchas cosas que me sirvieron y me servirán toda la vida.

Pero sobre todo agradezco a Dios.

Y A Todas Aquellas Personas Que De Alguna Manera Participaron Para Que Se Llevara A Cabo La Realización De Este Proyecto

DEDICATORIAS

A mi mamá

A mipapá

A mi hermana

Con mucho cariño, respeto y admiración.

A mis mejores amigos.

"Quien no conoce nada, no ama nada.

Quien no puede hacer nada, no comprende nada.

Quien nada comprende, nada vale.

Pero quien comprende también ama, observa, vé.

Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa,

Mas grande es el amor.

Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo

que las frutillas, nada sabe acerca de las uvas"

Paracelso

A quien compartió momentos muy especiales durante la carrera y que jamás olvidaré

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo Proyectos a Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al **Dr. Jaime Barral (IN200703)**.

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias** en la **Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (U.I.I.C.S.E.)** de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo de Agosto de 2003 a Agosto de 2004.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.

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

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
LOS GANGLIOS BASALES.....	¡Error! Marcador no definido.
EL NEOESTRIADO	¡Error! Marcador no definido.
LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL NEOESTRIADO	¡Error! Marcador no definido.
LOS PRINCIPALES TIPOS CELULARES EN EL NEOESTRIADO ...	¡Error! Marcador no definido.
a) Neuronas Espinosas Medianas (NEM's).....	¡Error! Marcador no definido.
b) Interneuronas.....	¡Error! Marcador no definido.
LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA.....	¡Error! Marcador no definido.
SINAPSIS ELÉCTRICA	¡Error! Marcador no definido.
SINAPSIS QUÍMICA	¡Error! Marcador no definido.
LA MODULACIÓN SINÁPTICA.....	¡Error! Marcador no definido.
MODULACION PRESINÁPTICA POR CANALES DE CALCIO Y DE POTASIO.¡	¡Error! Marcador no definido.
MODULACIÓN DIRECTA DE LA MAQUINARIA DE LIBERACIÓN¡	¡Error! Marcador no definido.
LOS CANALES IÓNICOS	¡Error! Marcador no definido.
CANALES DE POTASIO	¡Error! Marcador no definido.
ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE POTASIO	¡Error! Marcador no definido.
CANALES 6TM/1P	¡Error! Marcador no definido.
CANALES 4TM/2P	¡Error! Marcador no definido.
CANALES 2TM/1P	¡Error! Marcador no definido.
CANALES DE POTASIO PRESENTES EN LAS TERMINALES NERVIOSAS.¡	¡Error! Marcador no definido.
FARMACOLOGÍA DE LOS CANALES DE POTASIO.	¡Error! Marcador no definido.
JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
Generales.....	¡Error! Marcador no definido.
Particulares	¡Error! Marcador no definido.
MATERIAL Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
ORGANISMOS	¡Error! Marcador no definido.
SISTEMA DE ESTIMULACIÓN Y REGISTRO	¡Error! Marcador no definido.
POTENCIALES DE CAMPO.....	¡Error! Marcador no definido.
REGISTRO EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE CAMPO.....	¡Error! Marcador no definido.
FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO	¡Error! Marcador no definido.
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	¡Error! Marcador no definido.
ANÁLISIS DE DATOS.....	¡Error! Marcador no definido.
FÁRMACOS UTILIZADOS	¡Error! Marcador no definido.
RESULTADOS.....	¡Error! Marcador no definido.
PROTOCOLO DE FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO	¡Error! Marcador no definido.
PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO EN LA SINAPSIS CORTICO	
ESTRIATAL.....	¡Error! Marcador no definido.
EFECTO DEL BLOQUEO CON TETRAETILAMONIO	¡Error! Marcador no definido.
EFECTO DEL BLOQUEO CON TETRAETILAMONIO A DIFERENTES	
CONCENTRACIONES	¡Error! Marcador no definido.
EFECTO DEL BLOQUEO CON BARIO 400µM	¡Error! Marcador no definido.
CURVA DOSIS RESPUESTA DEL BLOQUEO CON BARIO.....	¡Error! Marcador no definido.
EFECTO DEL BLOQUEO CON CESIO 5 mM.....	¡Error! Marcador no definido.
EFECTO DEL BLOQUEO CON 4-AMINOPIRIDINA	¡Error! Marcador no definido.
CURVA DOSIS RESPUESTA DE 4-AMINOPIRIDINA.	¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIÓN.	¡Error! Marcador no definido.
CANALES DE POTASIO BLOQUEADOS POR TEA.....	¡Error! Marcador no definido.
CANALES DE POTASIO BLOQUEADOS POR BARIO Y CESIO. ¡	¡Error! Marcador no definido.
CANALES DE POTASIO BLOQUEADOS POR 4-AMINOPIRIDINA¡	¡Error! Marcador no definido.
CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
LITERATURA CITADA.....	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

El neostriado forma parte de los ganglios basales, los cuales están involucrados en la regulación de funciones motoras (mantenimiento de la postura, así como en la planificación y ejecución de movimiento), su disfunción causa enfermedades como la enfermedad de Parkinson, de Huntington y el Hemibalismo. Este núcleo recibe numerosas aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral sensorial, motora y de asociación, asimismo recibe información de los núcleos intralaminares del tálamo. También recibe entradas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* y entradas serotoninérgicas del núcleo del Rafe dorsal así como entradas del núcleo basolateral de la amígdala para el núcleo *accumbens*. En el presente trabajo se investigó que tipo de canales de potasio se encuentran presentes en las terminales glutamatérgicas de la sinapsis cortico-estriatal de la rata, los cuales participan en un gran número de funciones celulares, como el control de la excitabilidad eléctrica de la célula, son los responsables de restablecer el potencial de la membrana, participan en la hiperpolarización, modulan el rango de disparo, por lo que tienen una función importante de modulación sobre la liberación del neurotransmisor. Estos canales son puntos críticos para la regulación de la neurotransmisión en el sistema nervioso. Alteraciones en las funciones de estos canales pueden generar perturbaciones en la excitabilidad de la membrana y la función neuronal. Son sitios blanco de transmisores, de hormonas y de algunas drogas que modulan sus funciones. Por lo que es importante estudiar que canales de potasio están presentes en las terminales aferentes glutamatérgicas y cuales de ellos pueden ser activados por diversos neuromoduladores. Se utilizaron las técnicas convencionales de amplificación y registro extracelular y experimentos de oclusión farmacológica para determinar que canales de potasio se encuentran presentes en las terminales sinápticas. Se utilizaron antagonistas no específicos de los canales de K^+ : TEA (20 mM), bario (400 μ M), cesio (5 mM), y 4^-AP (1 mM), Debido a que estos agentes son bloqueadores no específicos de canales de potasio, nos basamos en la sensibilidad que los canales de potasio tienen para estos bloqueadores, en algunos casos se utilizaron diferentes concentraciones para ver la respuesta de los diferentes agentes bloqueadores sobre los canales de potasio que se encuentran en estas terminales sinápticas. Los resultados mostrados en el presente trabajo sugieren que se trata de un canal dependiente de voltaje, como podría ser el caso del canal de potasio Kv 1.4.

INTRODUCCIÓN

LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son núcleos subcorticales del cerebro medio y anterior. Estos núcleos están constituidos por el neostriado (formado por los núcleos caudado y putamen) (Lovinger y Tyler, 1996), el núcleo *accumbens*, la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr), la sustancia *nigra pars compacta* (SNc), los globos pálido externo (GPe) e interno (GPi), y el núcleo subtalámico (STN) (Brodal, 1992; Wilson, 1998; Smith, et al, 1998). Los ganglios basales desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones motoras, el mantenimiento de la postura, así como en la planificación, iniciación y ejecución del movimiento (Bargas, et al, 1998A, Graybiel, 1990), su disfunción puede causar desordenes motores asociados con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hemibalismo y diskinesia tardía (Wilson, 1998, Smith, et al, 1998).

En mamíferos, los Ganglios Basales se subdividen en dos componentes, los cuales constituyen los sistemas estriato-palidal dorsal y ventral. El sistema estriato-palidal dorsal consiste en la porción dorsal del estriado, o estriado propiamente dicho y el pálido dorsal. Este último se subdivide en dos partes con diferente conectividad y quimio-arquitectura: el segmento externo del globo pálido y el segmento interno del globo pálido. El sistema ventral estriato-palidal esta constituido por el estriado ventral (núcleo *accumbens* y parte del tubérculo olfatorio) y el pálido ventral. La naturaleza estriatal del núcleo *accumbens* y la

porción de células medianas del tubérculo olfatorio ha sido establecida en base a su desarrollo, conexiones y quimio-arquitectura. Mientras que el pálido ventral presenta características similares con el pálido dorsal (Wilson, 1998).

EL NEOESTRIADO

El neostriado constituye la principal entrada a los ganglios basales, pues recibe numerosas aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral sensorial, motora y de asociación, asimismo recibe información de los núcleos intralaminares del tálamo (Fig. 1). Recibe entradas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* y entradas serotoninérgicas del núcleo del Rafe dorsal así como entradas del núcleo basolateral de la amígdala hacia el núcleo *accumbens* (Afifi y Bergman, 1999; Brodal 1992; Wilson, 1998).

LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL NEOESTRIADO

El neostriado recibe aferencias de casi toda la corteza cerebral, por lo que en general se reconocen algunos circuitos corticales que inciden en el neostriado: a) El circuito sensorial motor, cuyas aferencias provienen de las cortezas motora primaria, premotora y suplementaria, que inciden en el putamen; b) El circuito oculomotor, con proyecciones de las cortezas parietal posterior, prefrontal y frontal, hacia el cuerpo del caudado; c) El circuito de asociación, que recibe aferencias de las cortezas parietal, premotora y prefrontal dorsolateral, estableciendo sinapsis con neuronas en la cabeza del caudado; y por último d) El circuito límbico que involucra proyecciones al núcleo *accumbens* y cabeza del caudado (Afifi y Bergman, 1999, Lovinger y Tyler, 1996).

Las principales aferentes glutamatergicas provenientes de la corteza y del tálamo, establecen contactos sinápticos sobre la cabeza de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. Se trata de sinapsis asimétricas, de tipo excitatorio. Las células piramidales que originan las aferentes que llegan al estriado provienen, al menos en la rata y el mono, de las capas corticales V y VI (Afifi y Bergman, 1999, Lovinger y Tyler, 1996).

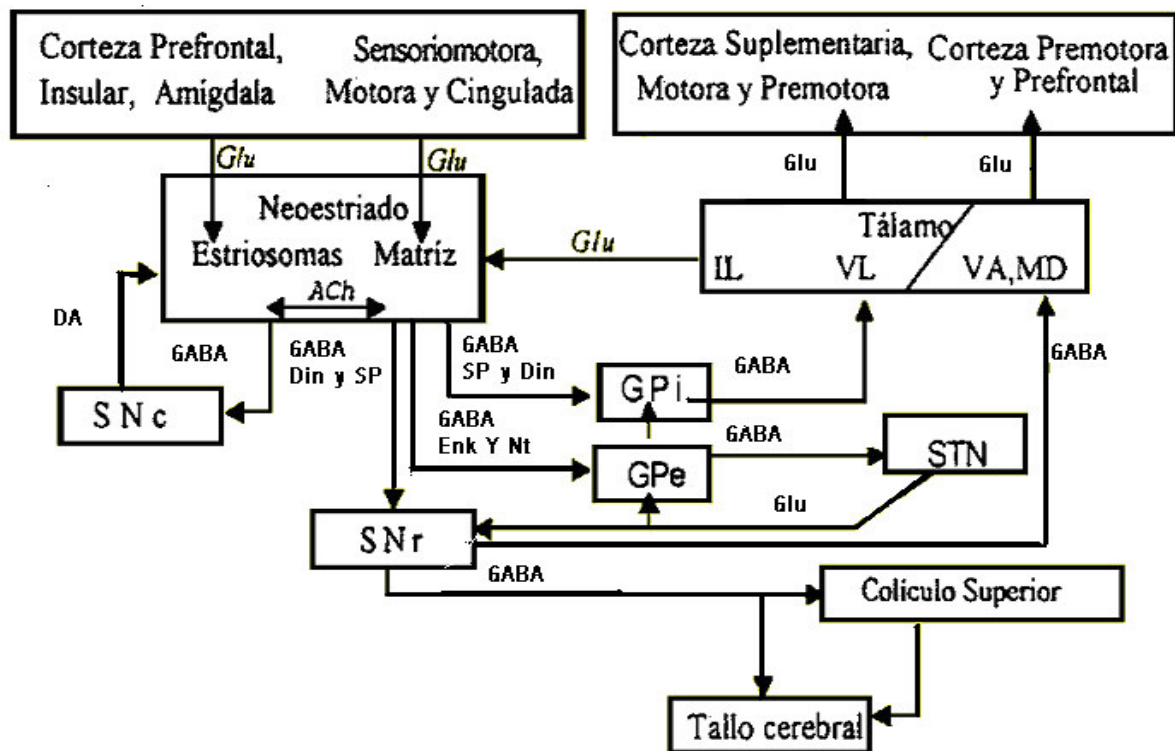


Figura 1 Principales aferentes y eferentes de los ganglios basales. En el diagrama se observa la compartimentalización de la entrada cortical hacia el núcleo estriado. Las neuronas de proyección de los estriosomas proyectan hacia la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y reciben aferentes de ella. Las neuronas espinosas medianas de la matriz proyectan hacia la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) así como a los globos pálido interno (GPi) y externo (GPe). El GPi proyecta hacia el tálamo ventral lateral, y éste a su vez envía terminales a regiones motoras de la corteza. El GPe proyecta recíprocamente al núcleo subtálmico (STN), este a su vez proyecta hacia la SNr. La SNr proyecta al tálamo ventral anterior (VA) y dorso medial (MD). Estos núcleos proyectan hacia las regiones límbicas de la corteza. En la figura se observan los sistemas neuroquímicos que participan en la mayoría de estas vías: Acetilcolina (ACh), dopamina (DA), dinorfina (Dyr), encefalinas (Enk), glutamato (Glu), ácido γ -aminobutírico (GABA), neurotensina (Nt) y sustancia P (SP) (Modificado de Barral 2001)

Por otro lado, las colaterales de las neuronas espinosas medianas así como los axones de diferentes interneuronas, establecen sus contactos sinápticos en el cuello de la espina dendrítica, o sobre la dendrita, de otras neuronas espinosas medianas (Wilson, 1998). En este último caso se trata de sinapsis simétricas de tipo inhibitorio (Shepherd y Koch, 1998). Sin embargo, las neuronas espinosas medianas son inhibitorias GABAérgicas, al igual que la mayor parte de las interneuronas del neostriado, por lo que se supone que el neostriado actúa para inhibir sus núcleos blancos. La mayor parte de las neuronas de proyección poseen colaterales axónicas locales que van dejando ramificaciones cercanas a las dendritas de las células vecinas. Por lo tanto, cuando las neuronas estriatales son excitadas, producen inhibición lateral en las neuronas que están a su alrededor. De este modo, las señales débiles son filtradas por las células que han recibido señales más intensas. Cabe resaltar que los núcleos de salida, (GPe, GPi, SNr), también poseen neuronas de proyección que son inhibitorias GABAérgicas. Por lo que se forma un circuito de dos sinapsis GABAérgicas inhibitorias en serie entre estas neuronas (Misgeld, et al, 1979; Bargas et al, 1998^a).

Cuando las neuronas del estriado son excitadas por las neuronas corticales, producen una disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas de los núcleos de salida, lo que a su vez desinhibe a las neuronas talámicas. Por lo tanto, cuando se activa el neostriado se desinhiben las vías tálamo-corticales, lo que facilita la acción de la vía piramidal. La actividad de las neuronas espinosas medianas de los mamíferos está siendo continuamente modulada por la actividad

de diversas sustancias que son liberadas en el neostriado (Parent y Hazrati, 1995 a y b).

LOS PRINCIPALES TIPOS CELULARES EN EL NEOESTRIADO

a) Neuronas Espinosas Medianas (NEM's).

La mayor parte de las neuronas en el neostriado (cerca del 95-96%) son de proyección, es decir, sus axones salen de este núcleo y establecen sinapsis fuera de él (Lovinger y Tyler, 1996; Smeets y Reiner, 1995; Flores-Hernández, 1997; Wilson, 1998). Reciben el nombre de neuronas espinosas medianas (NEM's) por el gran número de espinas dendríticas que poseen, así como por el diámetro de su soma (10-15 μm), además de que sintetizan y liberan GABA (Brodal, 1992).

Las neuronas del estriado pueden desplegar un pronunciado retardo en su transición de la descarga del potencial de acción que esta mediada por el desarrollo lento de la rampa de despolarización (Gabel y Nisenbaum, 1998). Se pueden agrupar en dos clases dependiendo de sus sitios blanco axonales, una clase de neuronas espinosas (aproximadamente la mitad), que proyecta hacia el segmento externo del globo pálido forma la vía directa. Mientras que otro tipo de neuronas espinosas medianas tiene sus axones altamente colateralizados, proyectando hacia el segmento externo e interno del globo pálido y a la sustancia nigra. Este grupo de neuronas forman la vía indirecta del neostriado (Wilson,

1998). Estas neuronas utilizan GABA como su principal neurotransmisor (Smith, et al, 1998).

b) Interneuronas

Existen, también neuronas cuyos axones se quedan en el propio neocórtex, estableciéndose como interneuronas (Lovinger y Tyler, 1996; Smith, et al, 1998; Wilson, 1998). Sus características se han determinado por registros intracelulares, técnicas de tinción e identificación inmuno-citoquímica basándose en el contenido de neuromoduladores y neurotransmisores (Wilson, 1998). De ellas se han descrito:

- 1) ***Interneuronas colinérgicas***: Representan menos del 2% de todas las células en el neocórtex, estas neuronas exhiben grandes árboles dendríticos y ejercen una poderosa influencia sobre el disparo de las neuronas de proyección (Wilson, 1998; Kawaguchi, 1993).
- 2) ***Células en canasta que contienen GABA y parvalbumina*** (Kita, 1993; Wilson, 1998). Son células no-espinosas que rodean a los somas de las neuronas espinosas medianas. Representan del 3 al 5 % del total de la población neuronal. Presentan disparo rápido y exhiben potenciales de acción de corta duración y un post-potencial hiperpolarizante pequeño; lo que permite el disparo sostenido a altas frecuencias y sin adaptación (Kawaguchi, 1993; Wilson, 1998).
- 3) ***Células que además de GABA contienen somatostatina y óxido-nítrico sintetas***. Representan menos del 2 % de la población neuronal (Di-Figlia y

Aronin, 1982; Takagi, et al, 1983; Wilson, 1998). Se trata de neuronas que presentan un disparo regular, una pronunciada adaptación a la frecuencia de disparo y potenciales con depolarización sostenida (Kawaguchi, 1993).

Las neuronas del neocórtex tienden a aglomerarse formando islas o parches quedando la mayoría de estas entre estos parches formando la matriz estriatal. Las capas profundas de la corteza cerebral proyectan hacia los parches estriatales, mientras que las capas superficiales proyectan hacia la matriz por medio de las neuronas piramidales de proyección y glutamatérgicas que hacen sinapsis con las neuronas estriatales medianas (Smith-Nielsen, 1997; Nicholls y Lopatin, 1997; Cingolani y Houssay, 1998).

LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

La transmisión sináptica es el mecanismo por el cual la información es transferida de una neurona a otra (Katz, 1966; Hammond, 2001), ocurre en sitios especializados llamados sinapsis, siendo este el principal sitio de comunicación entre las neuronas. Este proceso se puede llevar a cabo por dos mecanismos: uno eléctrico y otro químico (Smith-Nielsen, 1997; Nicholls y Lopatin, 1997; Cingolani y Houssay, 1998). Existen otros tipos de comunicación interneuronal, como la transmisión efáptica, que sin embargo no se relacionan con la transmisión sináptica (Kamermans y Fahrenfort, 2004; Kandel et al, 2000)

SINAPSIS ELÉCTRICA

En las sinapsis eléctricas parte del cambio en el potencial de membrana (Despolarización durante un potencial de acción) de la célula presináptica se difunde directamente a la célula postsináptica, (Cardinalli, 1992) por una vía de baja resistencia denominada unión estrecha o unión comunicante, formada por conexinas, se trata de un tipo de comunicación rápida y en forma bidireccional (Simon y Goudenough 1998). En este tipo de sinapsis no está involucrado ningún intermediario químico (Cardinalli, 1992).

SINAPSIS QUÍMICA

En las sinapsis químicas sí existe un intermediario químico (neurotransmisor) con el que la neurona presináptica se comunica con la neurona postsináptica. En la figura 2 se muestra una sinápsis química. En ella podemos observar dos componentes. Un componente presináptico y un componente postsináptico, el primero de ellos corresponde al elemento terminal del axón y la salida de la señal electroquímica que envía la neurona efectora conocida como terminal nerviosa o botón sináptico. En esta zona el axón se ensancha y su membrana forma el componente presináptico y se adosa a la membrana de la otra neurona especializada formando el componente postsináptico (Hammond, 2001; Kandel, et al, 2000; Zimmermann, 1993).

Este tipo de sinapsis se utilizan sustancias transmisoras o neurotransmisores con las que la neurona presináptica se comunica con la neurona postsináptica, estas sustancias transmisoras son sintetizadas y almacenadas en vesículas sinápticas, siendo liberadas posteriormente al espacio extracelular por la neurona presináptica. (Hammond, 2001; Kandel, et al, 2000; Katz, 1966). La probabilidad de liberación del neurotransmisor aumenta cuando la terminal presináptica es despolarizada por un potencial de acción (Kandel, et al, 2000). En este caso, se trata de exocitosis regulada por sensores que se activan con el cambio de la concentración interna de Ca^{2+} (Walmsley, et al, 1998; Hammond, 2001; Zimmerman, 1993; Johnston, y Wu, 1995; Kandel, et al 2000).

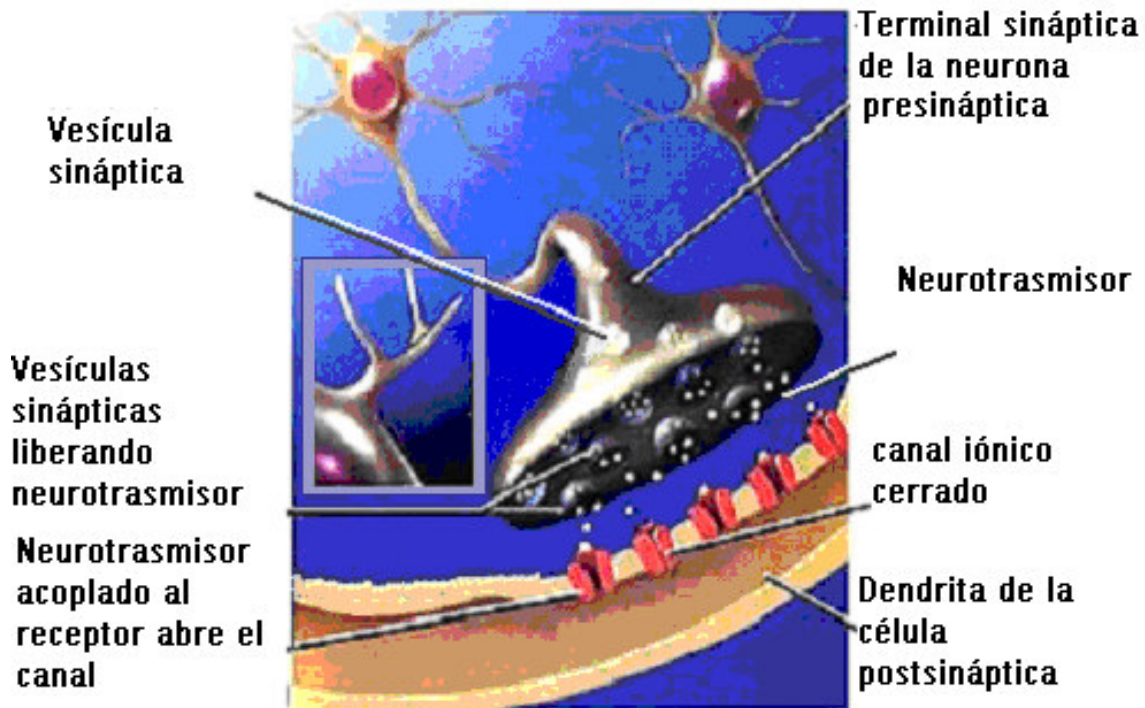


Figura 2. Sinapsis típica del sistema nervioso. En la figura se observan los componentes pre- y postsinápticos. En la parte presináptica se observan vesículas sinápticas que llegan al sitio activo donde se fusionan para liberar neurotransmisor y vesículas que se encuentran

en el sitio activo y que están liberando neurotransmisor al espacio sináptico y en la parte postsináptica se observan receptores postsinápticos que están reaccionando con el neurotransmisor que fue liberado, mismos que permiten la apertura de los canales iónicos que se encuentran de ese lado de la postsinápsis.

En condiciones de reposo la probabilidad de liberar una vesícula es muy baja. Esta probabilidad se incrementa poderosamente cuando la terminal nerviosa es despolarizada por un potencial de acción (Hammond, 2001; Debanne, et al, 1996; Zimmerman, 1993). Permitiendo la apertura de los canales de calcio sensibles al voltaje, presentes en la terminal presináptica. El calcio entra a través de estos canales evocando un incremento en la concentración de calcio intracelular, necesario para la liberación de vesículas sinápticas (Ver figura 3).

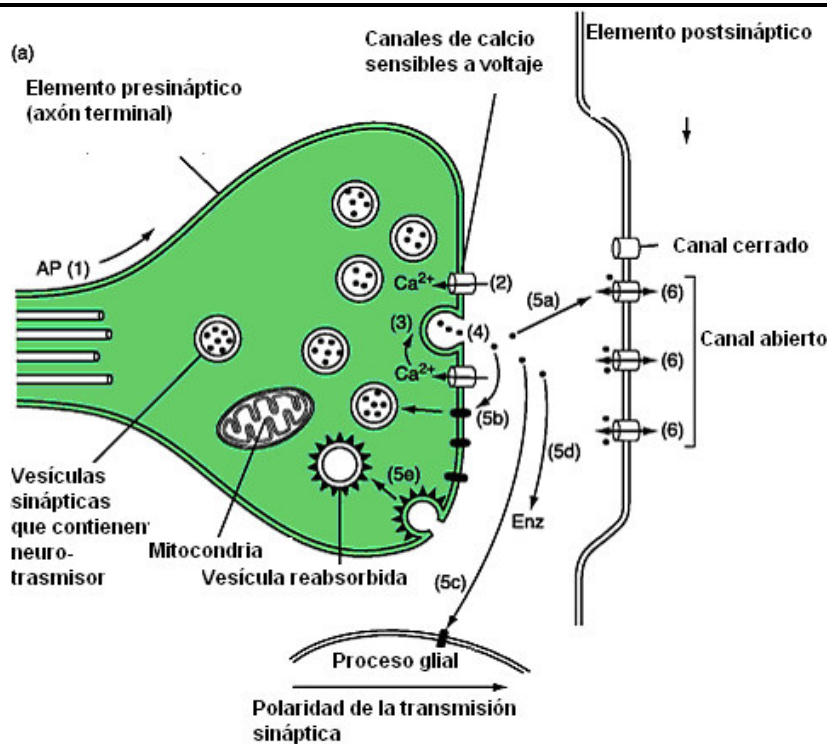


Figura 3. Liberación de Neurotransmisor. Se muestra como ocurre la liberación de neurotransmisor hacia el espacio sináptico. 1) llega el estímulo a la terminal presináptica produciendo un cambio en el potencial de membrana de la célula presináptica, 2) los canales de calcio dependientes de voltaje se abren; permitiendo la entrada de calcio a la terminal sináptica, 3) la entrada de calcio produce que las vesículas que están listas para ser liberadas se fusionen, 4) el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico, 5) el neurotransmisor reacciona con los receptores postsinápticos, o pueden ser degradadas por diversas enzimas, 6) la reacción del

neurotransmisor con el receptor postsináptico activa conductancias de los canales iónicos que se encuentran en ese lado (Modificado de Hammond, 2001).

La liberación de neurotransmisor ocurre en la zona activa del complejo sináptico (Walmsley et al, 1998). La liberación de las vesículas sinápticas en la terminal nerviosa sigue los siguientes pasos: 1) movilización: después de que se llenan las vesículas sinápticas de neurotransmisor por medio del transporte activo, las vesículas se trasladan hacia la zona activa, 2) atrancamiento: las vesículas se juntan en sitios definidos de la membrana plasmática presináptica, 3) *priming*: incluye reacciones dependientes de ATP que ocurren después de que la exocitosis pueda tomar lugar, 4) fusión: el incremento local de la concentración interna de calcio dispara la exocitosis de vesículas, 5) recuperación y reciclaje: las vesículas vacías se reciclan por medio de la endocitosis (Hammond, 2001)

LA MODULACIÓN SINÁPTICA.

La liberación de neurotransmisor está influenciada por diversos mecanismos. (Lovinger y Tyler, 1996). La activación de receptores presinápticos (autoreceptores, heteroreceptores) pueden regular la liberación de neurotransmisor, ya sea que modulen a los canales de potasio, modulando directamente a uno o más componentes del aparato vesicular de liberación, o inhiben los canales de calcio que se encuentran en las terminales nerviosas (Miller, 1998).

Los mejores candidatos que pueden producir neuromodulación son los neurotransmisores y algunas hormonas, pues actúan sobre los receptores de los

canales, los cuales afectan a través de la membrana: a los canales, bombas, enzimas, el citoesqueleto, los factores de transcripción, algunas proteínas, etc. Es decir, los neuromoduladores modulan regulando la actividad de la célula y puede alterar la actividad que una célula realiza.

MODULACION PRESINÁPTICA POR CANALES DE CALCIO Y DE POTASIO.

La modulación presináptica por canales de potasio consiste en activar conductancias de potasio como lo rectificadores entrantes u otros canales de potasio a través de receptores acoplados a proteínas G (Charlton, et al, 1982). Al incrementar la conductancia del ión potasio se disminuye la duración y la amplitud del potencial de acción en la terminal sináptica. Por lo tanto, la despolarización en la terminal sináptica es menos efectiva, ya que los canales de calcio menos tiempo abiertos y en consecuencia menos cantidad de neurotransmisor es liberado.

El influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de Voltaje juegan un papel importante de la liberación de neurotransmisor. Además de la actividad de los canales de calcio presinápticos, el curso temporal de la repolarización en un potencial de acción presináptico, es controlado por la actividad de los canales de potasio presinápticos, determinando la cantidad del influjo de calcio (Miller, 1998). Donde la activación y desactivación de muchos canales de potasio es voltaje dependiente, cualquier cambio en el potencial de la membrana como resultado de la invasión de potenciales de acción, podría alterar potencialmente la actividad de estos canales y por consiguiente modular el influjo de calcio en respuesta a los potenciales de acción subsecuentes. Así los niveles

de calcio intracelular pueden también regular a los canales de K^+ (Figura 4). La modulación dependiente de la actividad de las corrientes de potasio ha sido observada tanto pre como postsinápticamente (Hille, 2001; Quiang y Saggau, 1999; Miller, 1998).

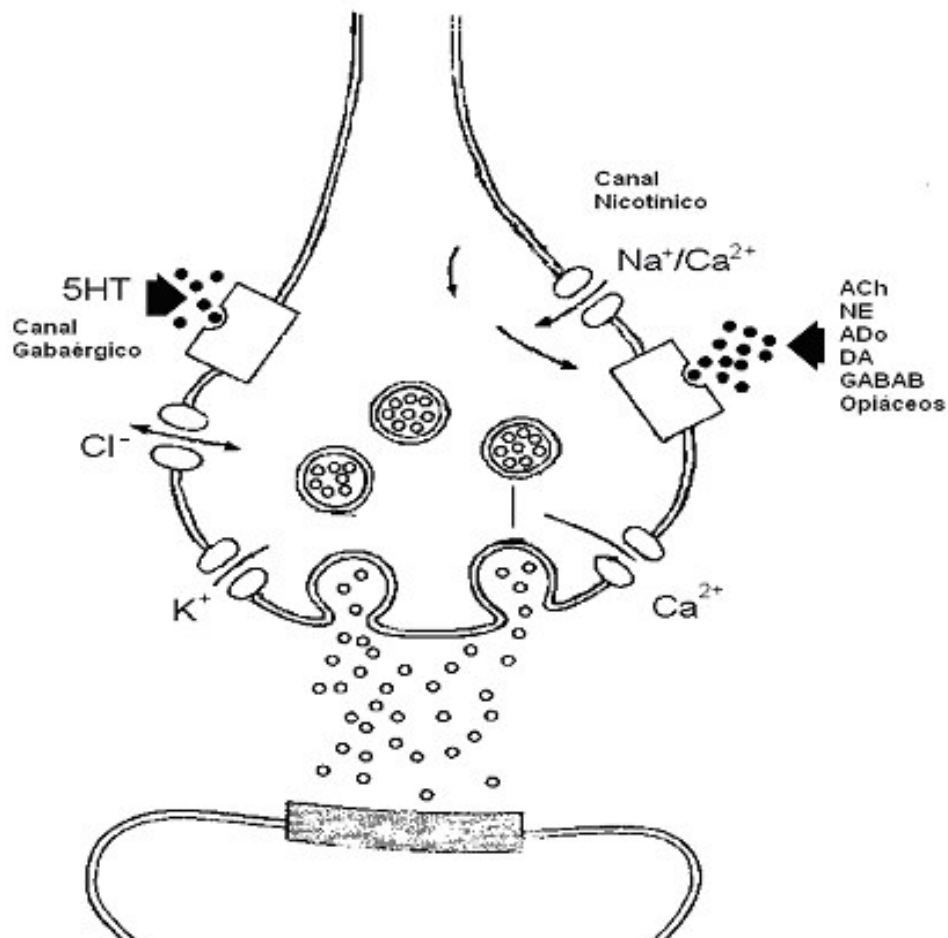


Figura 4 Modulación presináptica. Se observa que la modulación presináptica esta dada por la actividad de receptores presinápticos que pueden estar siendo activados por diversos neuromoduladores (Acetilcolina, Norepinefrina, Dopamina, GABA, Opiáceos, Serotonina). La activación de estos receptores presinápticos puede influenciar principalmente la actividad de los canales de calcio y de potasio que se encuentran en la terminal sináptica, haciendo mas o menos eficiente la liberación de neurotransmisor (Modificado de Barral, 2001).

MODULACIÓN DIRECTA DE LA MAQUINARIA DE LIBERACIÓN

El complejo de liberación contiene muchas proteínas importantes en el acople y liberación de las vesículas sinápticas. La activación de un receptor presináptico puede alterar las propiedades de una o más de estas proteínas inhibiendo la liberación de neurotransmisor de esta manera. (Miller, 1998.)

LOS CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos, están formados por proteínas de la membrana (Kaczorowski y García, 1999; Curran, 1998) que regulan importantes funciones en todos los organismos (Curran, 1998) entre las cuales encontramos el flujo de iones, la selectividad para uno o más tipos de iones pueden abrir o cerrar respondiendo a los estímulos eléctricos, mecánicos o químicos (Grippio y Grippio, 2001), tienen la sensibilidad de transmitir el potencial eléctrico a través de la membrana o por una sustancia neurotransmisora, y tienen la habilidad de ser modificados por una variedad de señales bioquímicas intracelulares (Wilson, 1998)

En los últimos años, algunos canales iónicos han podido ser investigados mediante alteraciones dirigidas en el canal (modulando), ya sea con moléculas o sustancias que llegan a actuar sobre ellos, alterando la actividad que realiza el canal, lo que puede ocasionar que a veces haya modificaciones en la transmisión

del mensaje, estas alteraciones pueden durar desde algunos segundos hasta varios minutos.

CANALES DE POTASIO

Entre los canales iónicos que se encuentran en las terminales nerviosas encontramos a los canales de potasio (Meir, et al, 1999; Millar, 1998) los cuales participan en un gran número de funciones celulares importantes (Kaczorowski y García, 1999), tales como: mediar el flujo de iones potasio entre el exterior y el interior de la célula a través de un poro (Choe, 2002). Los canales de potasio se activan por el cambio en el potencial de membrana, controlan la excitabilidad eléctrica de la célula (Kaczorowski y García, 1999), participan en la hiperpolarización, modulan el rango de disparo (Meir, et al; 1999; Tan, 1999), asimismo participan en la liberación de neurotransmisores (Kaczorowski y García, 1999), por lo que se les ha asociado con una función importante de modulación sobre la liberación del neurotransmisor (Meir, et al, 1999; Kaczorowski y García, 1999). Su actividad es controlada por el voltaje de la membrana, Ca^{2+} , Na^{+} , o por efectos de la fosforilación y/o segundos mensajeros, por lo que despliegan una gran variedad de características biofísicas (Gribkoff, et al, 2001).

Durante la década pasada, los canales de K^{+} han sido clonados, con lo que se definieron sus propiedades específicas como: la estequiometría de las subunidades, ensamblaje y modulación por segundos mensajeros (Char-chang, 2000), utilizando agentes bloqueadores permeables a la membrana celular y bloqueando la conducción de los canales (Kaczorowski y García 1999), o

disminuyendo la selectividad al ión. Por otro lado se han realizado estudios de mutagénesis dirigida en donde se puede ver como es la actividad de los canales cuando se alteran algunos de los genes que codifican para un canal en particular (Jarolimék, et al, 1998).

En la actualidad se conocen más de 100 genes que codifican para las diferentes familias de los canales de potasio (Phil, et al, 2000). Se sabe que la gran mayoría de las células, sino es que todas, tienen canales de potasio, pero aún no se ha establecido que tipos están presentes en cada una de ellas, ya que es difícil distinguir su contribución individual. Estos canales se encuentran tanto en eucariontes como en procariontes y constituyen un factor central para la vida celular (Hille, 2001). En organismos superiores los canales de potasio se han convertido en factores primarios del señalamiento intracelular, particularmente entre las neuronas (Choe, 2002; Char-Chang, 2000).

ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio son una ubicua y diversa familia de proteínas de membrana (Char-Chang 2000; Gribkoff, et al, 2001) altamente conservadas a través de los diferentes grupos filogenéticos (Gribkoff, et al, 2001). Estos canales están formados por dos subunidades, alfa y beta (Phil, et al, 2000), la subunidad responsable de la selectividad del ión es la subunidad alfa, se encuentra integrada a la bicapa lipídica (Fig. 5). La subunidad alfa tiene una región muy estrecha formada por aminoácidos, llamada "REGIÓN DEL PORO" o simplemente región P (Smith-Nielsen, 1997; Nicholls y Lopatin, 1997; Cingolani y Houssay, 1998; Choe,

2002). Esta subunidad se encuentra altamente conservada, ya que es la formadora del filtro de selectividad para los iones potasio (Hille, 2001). Estos canales generalmente actúan hiperpolarizando a las neuronas por medio de su apertura, permitiendo el flujo de K^+ hacia adentro de la célula en un gradiente de concentración (Gribkoff, et al, 2001).



Figura 5. Estructura de los canales de potasio. Se observa la zona que es selectiva a los iones potasio (región del poro). Tomado de Doyle, et al, 1996

Existen varias clases de canales de potasio (Phil, et al, 2000), comúnmente están divididos en cuatro clases estructurales, basándose en el número de dominios transmembranales y poros que contienen. Las cuatro clases están constituidas por: A) 6 dominios transmembranales con una región del poro, B) 2

dominios transmembranales con una región del poro, C) 4 dominios transmembranales con 2 regiones del poro, y D) 8 dominios transmembranales con 2 regiones del poro (Fig. 6). Estos se pueden dividir en familias dependiendo de sus propiedades biofísicas o en subfamilias dependiendo de la homología de las secuencias (Gribkoff, et al, 2001).

CANALES⁶TM/1P

Son una familia de proteínas de membrana que están muy relacionadas y que difieren en su desarrollo de apertura, conductancias y farmacología. Su inactivación esta en el rango de los milisegundos a segundos y los canales de potasio con diferentes propiedades de inactivación tienen un efecto diferente en la integración de la señal y en las propiedades del disparo repetitivo de la neurona (Choi, et al, 1991).

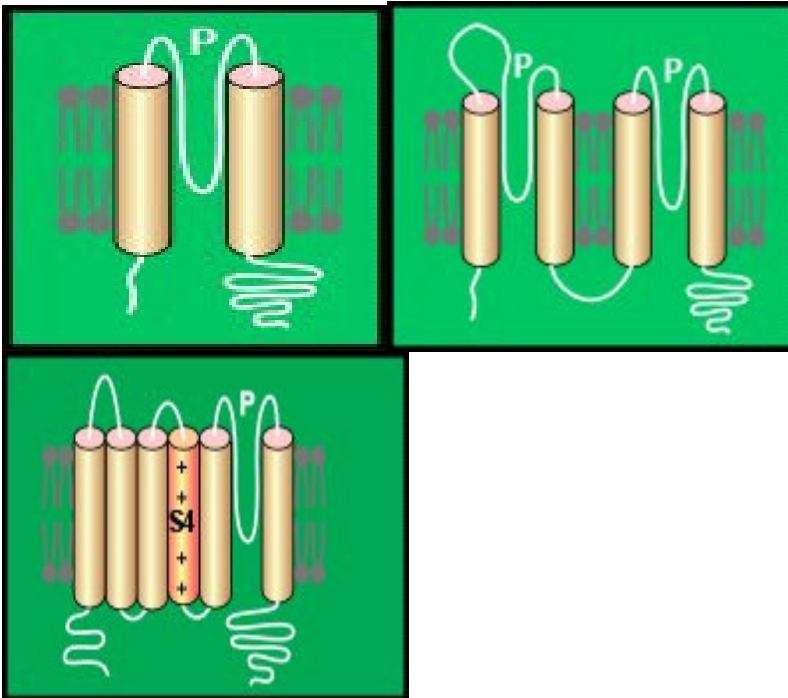


Figura 6. Clases estructurales de canales de potasio. En la figura se observan tres de las cuatro clases de canales de potasio. En el lado izquierdo se observa a la clase que tienen dos segmentos transmembranales y un poro (2TM/1P), en medio a la clase que tiene cuatro segmentos transmembranales con dos poros (4TM/2P) y en el lado de la izquierda se observa a la clase que tiene seis segmentos transmembranales y un poro (6TM/1P).

A esta familia corresponden los canales de potasio que se abren por cambios en el voltaje transmembranal, conocidos como canales Kv, que tienen 6 segmentos transmembranales (6TM) y una región P (1P), son comúnmente conocidos como canales 6TM/1P. En esta categoría se incluye a los canales de K⁺ dependientes de calcio, los cuales presentan una hélice adicional (llamada SO), localizada en el amino terminal del segmento transmembranal 1 (S1), la cual queda en el lado extracelular de la membrana, estos participan en el control de la excitabilidad eléctrica celular (Meir, et al; 1999). Esta familia incluye a los canales de K⁺ denominados como con Shaker y eter-a-go-go (Herg), así como canales de

K⁺ activados por calcio y canales KCNQ, activados por la despolarización (Figura 6) (Char- Chang, et al 2000).

Los canales pertenecientes a esta clase tienen importantes características como:

- 1) Canales dependientes de calcio: se pueden encontrar en neuronas a través del sistema nervioso de los vertebrados. Se activan por las concentraciones internas de calcio, o por el calcio interno y la despolarización, son llamadas conductancias pequeñas activadas por calcio (SK) y conductancias grandes (BK), respectivamente (Meir, et al; 1999). Los canales SK juegan un papel fundamental en todas las células excitables, ya que son canales independientes de voltaje. Son activados por un incremento en el nivel de calcio intracelular, como ocurre durante un potencial de acción. Su activación causa hiperpolarización de la membrana, la cual inhibe el disparo celular y limita la frecuencia de disparo de los potenciales de acción repetitivos. La fase inicial esta dada por la activación de los canales BK, mientras que la fase lenta esta dada por los SK, los cuales son abiertos solamente por iones calcio intracelularmente (Bond, et al,1999). Los canales BK, son canales dependientes de voltaje, su apertura es controlada por el voltaje transmembranal. Son altamente dependientes de la concentración intracelular de calcio, limitando la excitabilidad neuronal.

2) Los canales dependientes de voltaje se encuentran grandemente distribuidos en las neuronas. El rol de estos canales esta en que controlan el potencial de descanso de la membrana (Tan y Llano, 1999). Las corrientes de voltaje activadas por voltaje que se encuentran en las terminales nerviosas pueden ser moduladas sinápticamente por varias moléculas y drogas.

CANALES 4TM/2P

Otra de las familias de canales de potasio que contiene 4 dominios transmembranales y dos regiones P (4TM/2P) se conocen como “leak”, o canales de corriente de fuga (Phil, et al, 2000), intervienen en el mantenimiento del potencial de la membrana (Meir, et al; 1999). Representan la familia de canales de K^+ más abundante, con más de 50 tipos diferentes. (Char-hang, et al, 2000, Figura 6)

CANALES 2TM/1P

Quizás la familia de canales de potasio más simple, en cuanto a su arquitectura, se encuentra en la familia de los canales de potasio rectificadores entrantes (K_{IR}), estos canales están formados por 2 hélices transmembranales (2TM), y una región del poro entre ellos, (Char-chang, et al, 2000) de allí a que algunas veces se les llame como 2TM/1P (Phil, et al; 2000, Figura 6). Estos canales conducen las corrientes de K^+ en dirección entrante (Char-Chang, et al, 2000), por ello son importantes en el restablecimiento del potencial de la membrana durante el reposo. Estos canales son muy importantes en la regulación

de la secreción de la insulina, la respuesta a la isquemia cardiaca y cerebral, además, de que participan en el control del tono muscular vascular (Reimann y Ashcroft, 1999; Phil, et al, 2000)

Los canales K_{IR} cumplen dos funciones principales en la célula: Establecen el potencial de membrana en el reposo a valores cercanos al potencial de equilibrio para el K^+ y median el transporte de K^+ a través de la membrana (Jones, 1997; Reiman y Ashcroft, 1999). Estos canales conducen más corriente cuando el potencial de la membrana esta hiperpolarizado que cuando esta despolarizado. Esta propiedad resulta principalmente de su dependencia al voltaje bloqueando las corrientes salientes por cationes citoplásmicos (Mg^{2+} y poliaminas), que entran al poro por la influencia del campo de voltaje de la membrana e impiden el influjo de potasio. Estos cationes interactúan con residuos de cargas negativas del 2TM y/o con el carboxil terminal para inducir la rectificación entrante (Reiman y Ashcroft, 1999).

CANALES DE POTASIO PRESENTES EN LAS TERMINALES NERVIOSAS.

De acuerdo a Meir, et al, 1999, en las terminales nerviosas se pueden presentar los siguientes tipos de canales de potasio:

- a) Rectificador retardado (K_V): Sobresalientes en muchas células excitables, con potenciales de acción cortos (1-10 ms), son activados en la depolarización y exhiben poca o ninguna inactivación dentro de los cientos o miles de segundos.

- b) Transitorios rápidos A (K_A): activados en la despolarización, especialmente después de periodos de despolarización, y se inactivan rápidamente, usualmente entre 1-100 milisegundos.
- c) Canales de activación lenta: Se activan en la despolarización, comúnmente llamados K_S . Se activan en los últimos segundos, son menos selectivos.
- d) Canales dependientes de calcio (K_{Ca}): Se activan por las concentraciones micromolar internas de calcio, o por el calcio interno y la despolarización, se trata de los canales de potasio tipo SK y BK.
- e) Canales dependientes de ATP (K_{ATP}): Son canales de potasio insensibles al voltaje, normalmente cerrados, se activan cuando el nivel intracelular de ATP decrece.
- f) Canales S: Sensibles al voltaje, se cierran por acción de la serotonina (5-HT), se encuentran en neuronas sensoriales y en terminales nerviosas.

FARMACOLOGÍA DE LOS CANALES DE POTASIO.

Un avance importante en el estudio de los canales de K^+ ha sido el descubrimiento de agentes bloqueadores, toxinas y antagonistas para estos canales. Los bloqueadores de canales de potasio incrementan la liberación del neurotransmisor por el desbordamiento de potenciales de acción presinápticos, indicando que los canales de potasio dependientes de voltaje en la terminal nerviosa juegan un papel regulatorio en la liberación del neurotransmisor (Katz y Miledi, 1970).

Las corrientes de potasio abiertas por voltaje también pueden mediar la modulación sináptica por varias señales moleculares y drogas (Ishikawa, et al, 2003). Por lo que es importante conocer de qué forma llegan a actuar, algunos de estos agentes bloqueadores de canales de potasio que participan en la modulación presináptica cortico-estriatal. Entre los principales bloqueadores de canales de potasio tenemos:

- a) **Bario**. El bario es un bloqueador no específico de canales de potasio, que bloquea extracelularmente a los canales rectificadores entrantes (Nisenbaum y Wilson, 1995), los rectificadores retardados (Hille, 2001), y los canales de potasio que son dependientes de ATP, mientras que por el lado intracelular bloquea los canales de potasio dependientes de calcio (en específico a los BK). (Hille, 2001; Nisenbaum y Wilson, 1995). Este bloqueo ocurre ya que el bario tiene la misma estructura de cristal que el del ión potasio, o sea que tiene la misma afinidad que el ión potasio, bloqueando las conductancias del poro, así el bloqueo puede ocurrir tanto interna como externamente (Tagliatela , et al, 1993).

- b) **Cesio**. El cesio es un agente bloqueador no específico para los canales de potasio que extracelularmente puede bloquear a los canales de potasio rectificadores entrantes, (Nisenbaum y Wilson, 1995) a los rectificadores retardados, las corrientes tipo A (Bielefeldt, et al, 1992), y a los canales de potasio dependientes de ATP en tanto que por el lado intracelular puede bloquear al canal rectificador retardado (Hille, 2001). Bloquea

presinápticamente a los canales de potasio dependientes de calcio cuando se aplica extracelular o intracelularmente (Meir, et al, 1999).

- c) **Tetraetilamonio** (TEA): Clásico bloqueador de canales de K^+ , utilizado como un prueba molecular para la boca del poro interno o externo de los canales de potasio dependientes de Voltaje (Denton y Leiter, 2002, Crouzy, et al, 2001), bloqueando la vía de permeación, ocluyendo el movimiento de los iones potasio a través del poro (Crouzy, et al, 20001). Se trata de un pequeño ión que bloquea los canales de potasio abiertos, pudiendo actuar tanto externa como internamente (Crouzy, et al, 2001, Meir, et al; 1999; Hille, 2001), pues al actuar por el lado extracelular bloquea (con diferentes afinidades. Ver Tabla I) a los canales rectificadores retardados, la corriente A, a la corriente dependiente de calcio (específicamente BK), (Meir, et al; 1999; Hille, 2001), rectificador entrante y a los canales de potasio dependientes de ATP (Takako, et al, 1996); mientras que por el lado intracelular no bloquea a las corrientes rectificadoras entrantes (Hille, 2001). Se sabe que 20 mM de TEA bloquea completamente a los BK, y a la mayor parte, sino es que a los subtipos de canales Kv, excepto a Kv1.1 y Kv1.2 (Takako. 1996).

Por otro lado, los canales de potasio se pueden dividir en dos categorías dependiendo la sensibilidad del cana hacia el TEA: aquellos que son altamente selectivos (K_i menor a 1 mM) y aquellos que son relativamente insensibles (K_i mayor a 20 mM). Se sabe que el canal *Shaker* de K^+ , tiene alta afinidad al TEA, en estos canales el receptor al TEA esta formado por un brazaletes de 4

residuos aromáticos posicionados en la boca externa del poro, el TEA interacciona simultáneamente con estos residuos, para producir el bloqueo de la boca del poro con alta afinidad (Denton y Leiter, 2002).

<i>Canal de potasio</i>	<i>TEA</i>	<i>Ba²</i>	<i>Cs⁺</i>	<i>4-AP</i>
KV	Intra +	Intra ++	Intra +++	Intra ?
Rectificadores retardados	Extra +	Extra ++	Extra +	Extra +++
A Transitoria Rápida	Intra + Extra ++	Intra + Extra -	Intra + Extra -	Intra ? Extra +++
KCa²⁺ Dependientes de Calcio	Intra + Extra ++	Intra + Extra ++	Intra + Extra -	Intra - Extra -
KIR Rectificadores Entrante	Intra ? Extra +	Intra ? Extra ++	Intra ? Extra +	Intra - Extra -
KATP Dependientes de ATP	Intra + Extra ++	Intra ? Extra ++	Intra + Extra +	Intra - Extra -

Tabla I. Bloqueadores de canales de potasio. Tabla en donde se muestran diferentes canales de potasio y sus diferentes bloqueadores. Nótese que pueden actuar tanto intracelularmente como extracelularmente, y que la sensibilidad de cada canal difiere para cada uno de los agentes bloqueadores de canales de potasio (signos positivos sensibilidad al bloqueador; signos negativos insensibilidad al bloqueador, signos de interrogación no hay datos que sugieren la sensibilidad al agente bloqueador). (Bargas, et al, 1999; Castle, et al, 1989; Char-chan, 2000; Coetzee, et al, 1999; Denton y Leiter, 2002; Hille, 2001; Kaczorowsky y Garcia, 1999; Meir, et al, 1999; Nisenbaum y Wilsonl, 1995; Takako, et al, 1996; Tan and Llano, 1999).

d) **4-Aminopiridina** (4-AP). Ha sido utilizado como un agente farmacológico en diversos estudios de los canales de K⁺, en mecanismos de epileptogénesis, y en plasticidad sináptica. Además ha sido usado como tratamiento para el Síndrome de Lambert-Eaton y en *miastenia gravis* (Kita, et al, 1985). Es un

bloqueador de canales de potasio, que estimula la liberación de neurotransmisor (Peña, et al, 2002; Kita, et al, 1985,). Es conocido por facilitar la transmisión sináptica, también se considera como un agente anti-curare, (Kita, et al, 1985). La aplicación de 10 mM de esta toxina, bloquea completamente las corrientes trascendentes mientras se reduce la corriente persistente aproximadamente en un 40% ($IC_{50} = 125 \text{ mM}$).

JUSTIFICACIÓN

Una dificultad significativa para la industria farmacéutica es la identificación y selección inicial de puntos blanco moleculares para que el desarrollo de nuevas drogas pueda ser iniciado. Estos blancos moleculares tienen que reunir diferentes características como: se tienen que conocer sus funciones biológicas, hacer ensayos *in vitro* y tienen que ser accesibles para pequeños componentes *in vivo*. Los canales iónicos tienen muchos de estos atributos y son vistos como puntos blancos de pequeñas drogas moleculares.

Es importante recalcar que los canales de potasio son estructuras críticas para la regulación de la neurotransmisión en el sistema nervioso. Alteraciones en las funciones de estos canales pueden generar perturbaciones en la excitabilidad de la membrana y la función neuronal. Son sitios blancos de transmisores, de hormonas y de algunas drogas que modulan sus funciones. Por lo que es importante estudiar que canales de potasio se encuentran presentes en las terminales aferentes glutamatérgicas y cuales de ellos pueden ser activados por diversos neuromoduladores.

Por lo que con base a lo anterior, se proponen los siguientes:

OBJETIVOS

Generales

- Proporcionar evidencia acerca de la modulación presináptica producida por la activación de canales de potasio en la sinapsis cortico-estriatal de la rata.
- Identificar los canales de potasio que están presentes en las terminales sinápticas de las aferentes glutamatérgicas que llegan al neocórtex de la rata y que son susceptibles de ser activados por la acción de diversos neuromoduladores.

Particulares

- Establecer la participación de conductancias de potasio en la modulación presináptica
- Analizar la acción de diversos bloqueadores de canales de potasio sobre la modulación presináptica.
- Identificar cual o cuales canales de potasio podrían estar participando en la modulación presináptica cortico-estriatal.

MATERIAL Y MÉTODOS

ORGANISMOS

Se obtuvieron rebanadas de cerebro de rata Wistar macho (100-120 g de peso), que fueron alimentadas libremente. Para ello, las ratas fueron previamente anestesiadas con éter etílico e inmediatamente decapitadas, el cerebro fue rápidamente removido y sumergido en solución salina isotónica (en mM: 125.0 NaCl, 3.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25.0 NaHCO₃, 11.0 Glucosa) saturada con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂, con un pH de 7.4. Manteniéndose a una temperatura de 4 ± 1 °C. Después se separaron bulbos olfatorios, cerebelo y hemisferios cerebrales. Estos últimos fueron colocados en un vibratomo donde se obtuvieron las rebanadas de 400 µm de espesor, que se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo no menor a 60 min. En estas condiciones fue posible obtener registros confiables durante más de 10 hr (Bargas, 1998; Barral, 2001; Flores-Hernández, 1997 Hernández-Echeagaray, et al, 1998).

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

SISTEMA DE ESTIMULACIÓN Y REGISTRO

El potencial de campo es un registro extracelular de las corrientes iónicas asociadas a la actividad de una población de neuronas, las cuales producen espigas poblacionales, este se amplificó y se desplegó en un osciloscopio de rayos catódicos. Los registros extracelulares fueron digitalizados y almacenados en cintas de video VHS a 40 KHz para ser analizados al finalizar el experimento.

Todos los registros fueron filtrados de 1 a 3 KHz y digitalizados simultáneamente por un digitalizador (Instrutech Corp. NY USA) y una tarjeta AT-MIO-16E10 National Instruments (Austin, TX, USA) en una computadora usando programas desarrollados en el laboratorio en el ambiente LabView (National Instruments, Austin TX, USA).

El digitalizador Instrutech fue utilizado para almacenar los experimentos en cinta de video, mientras que el sistema AT-MIO16E10 se utilizó para almacenar los datos en archivos de código ASCII o en binario en el disco duro de la computadora para su posterior análisis. Posteriormente los registros se midieron, promediaron y graficaron utilizando software comercial (Origin, Microcal Software. Northampton, MA. USA)

POTENCIALES DE CAMPO

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

El fluido extracelular constituye un volumen conductor alrededor de las neuronas, las que al estar en reposo, su membrana no producen flujo de corriente, Sin embargo al ser activadas por un impulso nervioso, la polarización deja de ser uniforme y se producen flujos de corriente de una parte de la neurona a la otra, formando un dipolo a través del fluido extracelular, estableciendo un campo eléctrico

REGISTRO EXTRACELULAR DE POTENCIALES DE CAMPO

El potencial de campo registrado extracelulármente consiste en una onda trifásica producida por la diferencia de potencial, debida al cambio en la localización de los sumideros y las fuentes de corriente activa. A la zona en que las corrientes fluyen hacia el interior de la célula se le denomina sumidero (corrientes entrantes activas) y a la zona en que ésta sale se le llama fuente (corrientes salientes que cierran el circuito). En el registro extracelular las corrientes salientes se observan como deflexiones positivas, mientras que cuando

se observan deflexiones negativas se trata de corrientes entrantes (Johnston y Wu, 1995).

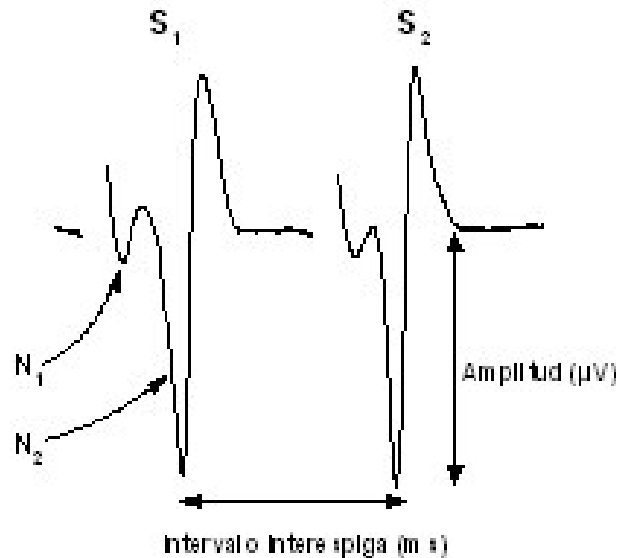


Figura 7. Registro extracelular de potenciales de campo. Con el protocolo de facilitación por pulso pareado es posible obtener dos respuestas (S₂-S₁). En esta figura se observa que en cada respuesta hay dos negatividades (N₁-N₂). La primera corresponde al potencial antidrómico. La segunda al potencial sináptico. Los intervalos de tiempo entre cada respuesta varían de entre 10-40 ms. la intensidad del estímulo se ajusta para que la amplitud de las respuestas sea de la misma magnitud.

Por lo general la medición que hace el electrodo de registro se realiza comparando los voltajes entre el electrodo de registro y la tierra de referencia. A la neurona se le puede considerar como un dipolo eléctrico ya que durante el pico del potencial de acción en la membrana del soma se da lugar a una corriente activa (sumidero). En las dendritas se da una corriente pasiva (fuente) que cierra

el circuito, las cuales son positivas con respecto al soma. Las aferentes sinápticas dan lugar a cambios en estas corrientes (Figura 7). En ese sentido, las entradas sinápticas excitatorias que dan lugar a una corriente entrante en las dendritas (sumidero) producen en el soma corrientes salientes pasivas (fuente). Como estas corrientes cambian con el tiempo, es común obtener ondas trifásicas, que representan la propagación del potencial de acción (Johnston y Wu, 1995).

Cuando se registra cerca de los somas neuronales se observa solamente una onda bifásica que consiste en una espiga negativa seguida de otra positiva. Esto se debe a que el potencial de acción produce una rápida despolarización de la membrana por las corrientes entrantes de sodio, así como una rápida repolarización por las corrientes salientes de potasio. El componente negativo corresponde a la despolarización de la membrana del soma por el flujo de corriente entrante. La fase positiva corresponde a la reversión en el flujo de corriente (Johnston y Wu, 1995).

FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO

Para evidenciar los eventos presinápticos así como también la participación de los canales de potasio presinápticos se utilizó el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP), bloqueando las conductancias de potasio (Fig. 7). Para entender el paradigma de la facilitación por pulso pareado, se han planteado varias hipótesis una de ellas es la inactivación de corrientes de K^+ en la terminal presináptica, lo que provocaría incremento en el influjo de Ca^{2+} extracelular (Andrew y Dudek, 1985). Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco estudiada.

Quizás, la hipótesis más aceptada sea la del Ca^{2+} residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's. (Katz y Miledi, 1968; Katz y Miledi 1970)

La hipótesis del Ca^{2+} residual se basa en la afirmación de que la entrada de Ca^{2+} es esencial para la liberación de neurotransmisor. De tal modo que cuando nosotros bloqueamos conductancias de potasio la concentración de calcio se incrementa en el interior de la célula, debido a que los canales de calcio que se encuentran en la terminal sináptica permanecen más tiempo abiertos (Barral et al, 2003). Pequeñas modificaciones en la concentración de Ca^{2+} celular bastan para alterar sensiblemente la aparición espontánea de potenciales miniatura, y por lo tanto liberación de neurotransmisor (Del-Castillo y Katz, 1954a; Del Castillo y Katz, 1954b). Así, cuando se mandan trenes de estímulos a intervalos cortos de tiempo se observa ya sea un progresivo incremento (facilitación, aumentación o potenciación), o bien, un decremento en la amplitud de las respuestas sinápticas (depresión). Esto quiere decir que grandes cambios en la liberación de neurotransmisor pueden deberse a pequeños cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} seguida de un pulso nervioso (Barral et al, 2001). Los experimentos se realizaron en presencia de Bicuculina (10 mM) con el fin de eliminar el componente inhibitorio que activa receptores GABA_A .

El influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de Voltaje juegan un papel importante de la liberación de neurotransmisor, Además de la actividad de los canales de calcio presinápticos, el tiempo del curso de la repolarización en un potencial de acción presináptico, es controlado por la

actividad de los canales de K^+ presinápticos, determinando la cantidad del influjo de calcio. Donde la activación y desactivación de muchos canales de K^+ es voltaje dependiente, cualquier cambio en el potencial de la membrana como resultado de la invasión de potenciales de acción podría alterar potencialmente la actividad de estos canales y por consiguiente modular el influjo de calcio en respuesta a los potenciales de acción subsecuentes. Así los niveles de calcio intracelular pueden también regular a los canales de K^+ . (Quian y Saggau, 1999).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se aplicaron dos estímulos de igual intensidad con el fin de determinar la FPP. La cual se evaluó como el cociente entre la amplitud de la respuesta ortodrómica al segundo estímulo (S_2) entre la respuesta al primer estímulo (S_1):

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

que expresado en porcentaje queda:

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

Durante el control (primeros 10 minutos de cada experimento), la intensidad de los estímulos se ajustó para ver la FPP ($S_2/S_1 \geq 1$). Esto permite detectar con facilidad los cambios provocados por los bloqueadores de canales de K^+ . El intervalo íter-estímulo seleccionado osciló entre 20 y 40 ms, que es donde se observa de manera óptima la FPP (Barral, 2001). Los experimentos se realizaron

en presencia de bicuculina (10 μ M) con el fin de eliminar el componente inhibitorio GABA_A.

ANÁLISIS DE DATOS

La significancia estadística de los cambios observados con el protocolo de facilitación por pulso pareado se determinó tomando muestras de datos antes (control) y después de la aplicación de los diferentes bloqueadores de canales de potasio. Los cambios en la facilitación por pulso pareado se expresaron en porcentajes. Se aplicaron pruebas paramétricas (*t* de Student para datos apareados) y no paramétricas (U-Mann-Whitney). Utilizando software comercial Minitab (State College, PA) (Daniel 2002; Brown y Rhotery, 1993)

FÁRMACOS UTILIZADOS

Para la realización del presente trabajo se utilizó: Bicuculina, antagonista GABA_A; antagonistas no específicos de canales de potasio: cesio, bario, Tetraetilamonio (TEA), 4-Aminopiridina (4-AP), todos adquiridos de SIGMA (St Louis, Mo). Todos ellos se prepararon en soluciones stock y se disolvieron en la solución salina, siendo agregados a la preparación a través del sistema de perfusión a la preparación.

RESULTADOS

PROTOCOLO DE FACILITACIÓN POR PULSO PAREADO

El primer punto que nos propusimos demostrar fue el de la utilidad del protocolo que utilizamos, en este caso, el protocolo que utilizamos nos sirve para evidenciar eventos presinápticos, donde manipulamos ciertos parámetros para que la evidencia sea más directa. En la figura 8 se muestra un experimento representativo en donde manipulamos a los canales de potasio y de calcio, que se encuentran en la terminal sináptica cortico-estriatal, por medio de bloqueos farmacológicos utilizando bloqueadores no específicos.

En la figura 8A se observa el curso temporal de un experimento representativo. Las barras indican el momento en el que fue administrado el agente bloqueador. Los números indican puntos seleccionados para ser representados en B. En la figura 8B se observan registros representativos del experimento. En esta figura se puede apreciar que al agregar bario (bloqueador inespecífico de canales de potasio), la liberación de neurotransmisor se hace más efectiva, y lo vemos como una depresión por pulso pareado, o sea que hubo un incremento en la respuesta S_1 con respecto a la segunda respuesta (S_2), debido a que la terminal sináptica permanece más tiempo despolarizada por el bloqueo de los canales de potasio, esta despolarización permite que los canales de calcio dependientes de voltaje permanezcan más tiempo abiertos, dejando entrar más cantidad de calcio a la terminal sináptica, por otro lado, si agregamos cadmio al medio de perfusión (bloqueador inespecífico de canales de calcio), la

liberación de neurotransmisor se hace menos efectiva y lo vemos como una facilitación por pulso pareado, o sea que después de la aplicación del cadmio, la respuesta S_2 es mayor que la respuesta S_1 .

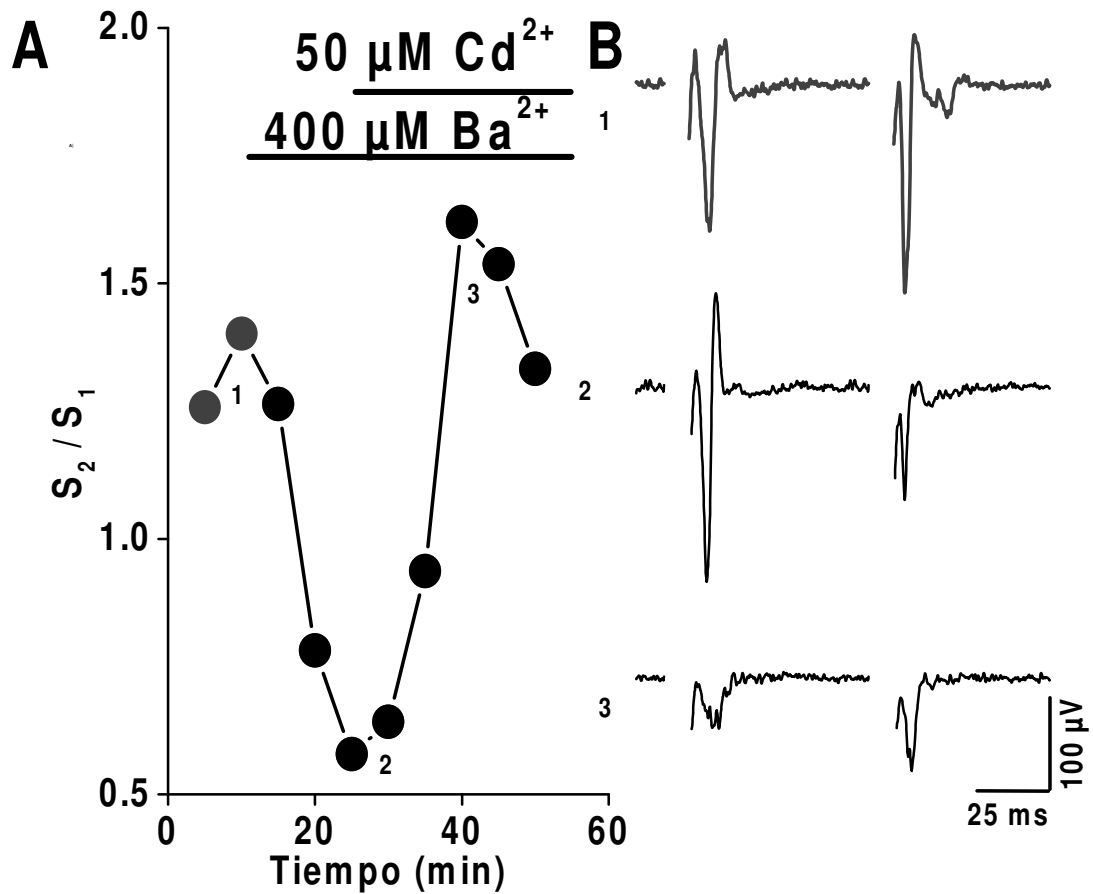


Figura 8. Efecto de los bloqueadores no específicos para canales de potasio y de calcio. En A observamos el curso temporal de un experimento representativo del bloqueo con bario ($400 \mu\text{M}$, bloqueador no específico de canales de potasio) y de cadmio ($50 \mu\text{M}$, bloqueador no específico de canales de calcio). La barra no indica el tiempo en el que fue administrado el agente bloqueador, los números nos indican puntos del experimento que fueron tomados para ser representados en B. Observamos el cambio de las amplitudes en el transcurso del tiempo. En B observamos trazos representativos del experimento.

PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO EN LA SINAPSI CORTICO ESTRIATAL.

Por otro lado, nos enfocamos en determinar que tipo de canales de potasio se encuentran participando en la modulación de la liberación de neurotransmisor de la sinapsis cortico-estriatal de las aferentes glutamatérgicas en el neostriado de la rata. En este caso se utilizaron antagonistas no específicos de los canales de K^+ : TEA (20 mM), bario (400 μ M), cesio (5 mM), y 4 -AP (1 mM), utilizando experimentos de oclusión farmacológica de estos canales.

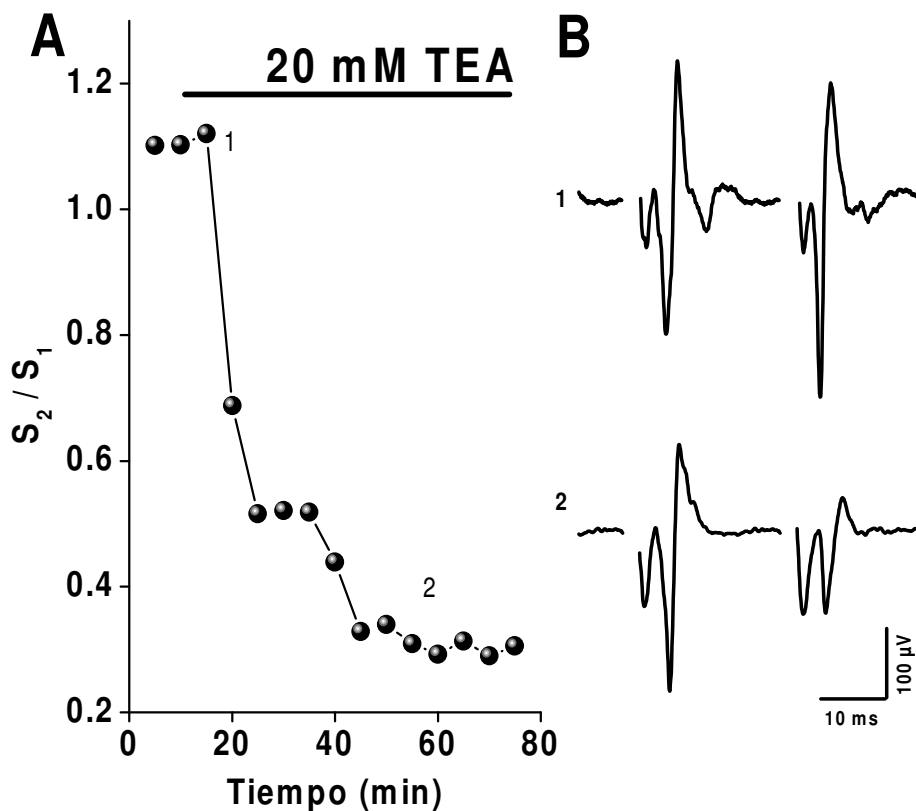


Figura 9 Efecto del bloqueo con Tetraetilamonio (20 mM). En a) Curso temporal de la aplicación TEA, La barra nos indica el tiempo de exposición al bloqueador, se observa que el tetraetil amonio produce depresión por pulso pareado. Los números nos indican puntos que fueron

tomados para ser representados en el panel B. En b) Registros representativos del experimento: 1) Control, con Facilitación; 2) Experimental, efecto de TEA. Depresión

Debido a que estos bloqueadores no son específicos, nos basamos en la sensibilidad que los canales de potasio tienen para cada uno de estos agentes. En algunos casos se utilizaron diversas concentraciones para ver la respuesta de los diferentes agentes bloqueadores sobre los canales de potasio que se encuentran en estas terminales sinápticas.

EFEECTO DEL BLOQUEO CON TETRAETILAMONIO

Para determinar si en las terminales sinápticas glutamatérgicas que llegan al estriado de la rata se encuentran participando los canales de potasio utilizamos Tetra-etilamonio (TEA). Este bloqueador como ya se ha hecho notar puede actuar tanto extracelular como intracelularmente, se sabe que a altas concentraciones bloquea casi todas las conductancias de los canales de potasio (Hille, 2001). En la figura 9 podemos observar un experimento representativo del efecto del bloqueo con TEA (20 mM). En la figura 9A observamos el curso temporal de la aplicación de Tetraetilamonio, la barra nos indica el tiempo de exposición al agente bloqueador (TEA 20 mM). Los números nos indican puntos del experimento que fueron tomados para ser representados en B, en este experimento representativo se observa el cambio de las amplitudes S_2/S_1 a través del tiempo de exposición al agente bloqueador con respecto a los controles, este agente tuvo su efecto máximo 40 minutos después de su aplicación observándose una disminución de la facilitación por pulso pareado de $-25.05 \pm 8.50 \%$; Mediana = 22.46%; $n = 6$ ($p < 0.05$; U de Mann Whitney) con respecto a los controles.

EFFECTO DEL BLOQUEO CON TETRAETILAMONIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES

Con el fin de determinar el efecto de Tetraetilamonio a diferentes concentraciones utilizamos varias concentraciones (300 μ M, 1mM, 3mM, 10 mM, 30 mM). Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 10 , el efecto que obtuvimos con este agente bloqueador oscila entre -35 y -23 % sobre la facilitación por pulso pa-

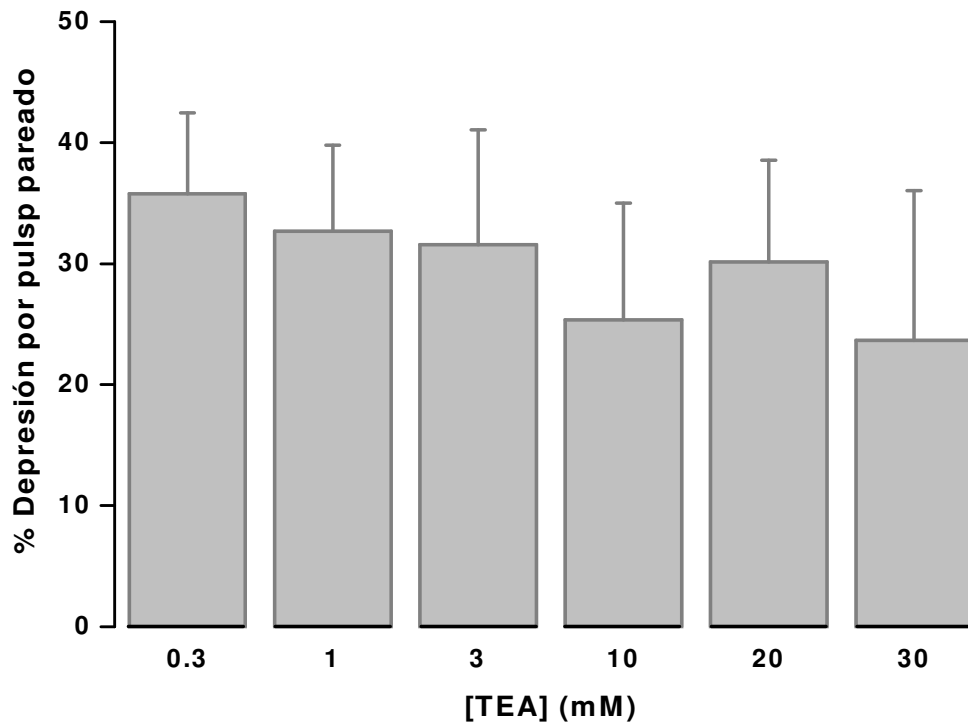


Figura10: Relación Dosis Respuesta de Tetraetilamonio. Relación de las diferentes concentraciones de TEA sobre los canales de potasio. Nótese que a mayor concentración el efecto es más inespecífico.

reado con respecto a los controles, podemos observar que la relación dosis/respuesta que obtuvimos con las diferentes concentraciones de TEA no es una relación dosis dependiente. Estos datos nos están indicando que la modulación de la liberación de neurotransmisor, en este caso, no es dependiente de la concentración que utilizemos de TEA, además que se puede observar que hay una baja sensibilidad a este agente bloqueador.

EFEECTO DEL BLOQUEO CON BARIO 400 μ M

Para discriminar la participación de algunos canales dependientes de voltaje, utilizamos bario (400 μ M). En la figura 11 observamos un experimento representativo del bloqueo con bario (400 μ M). En la figura observamos el curso temporal del experimento donde se observa el cambio de la relación de las amplitudes S_2/S_1 , la barra nos está indicando el tiempo de exposición al agente bloqueador, se puede apreciar que se inicia el experimento con una gran facilitación (para evidenciar mejor el cambio en la FPP producido por el bloqueo de las corrientes de potasio). En la figura 11A se observa que el bario provoca una disminución de la facilitación por pulso pareado con respecto a los controles de -52.73 ± 17.75 % (mediana -52.74 %; $n = 10$, $p < 0.001$; U de Mann-Whitney). El signo negativo nos está indicando que se trata de una depresión por pulso pareado PPD (Barral et al, 2001). El efecto máximo de este agente bloqueador se obtuvo 40 minutos después de la aplicación. En la figura 11B observamos trazos representativos del experimento.

CURVA DOSIS RESPUESTA DEL BLOQUEO CON BARIO.

Para determinar cual es la concentración efectiva media a la cual se bloquean los canales de potasio que son sensibles a bario hicimos una curva dosis respuesta de bario, en ella las concentraciones fueron desde 30 μM hasta 5 mM. En la figura 12 se observa cual es el efecto de las diferentes concentraciones de bario, vemos que el efecto de las diferentes concentraciones es una relación dosis dependiente. La dosis efectiva media que obtuvimos fue de 521.955 μM . El número de Hill obtenido fue cer-

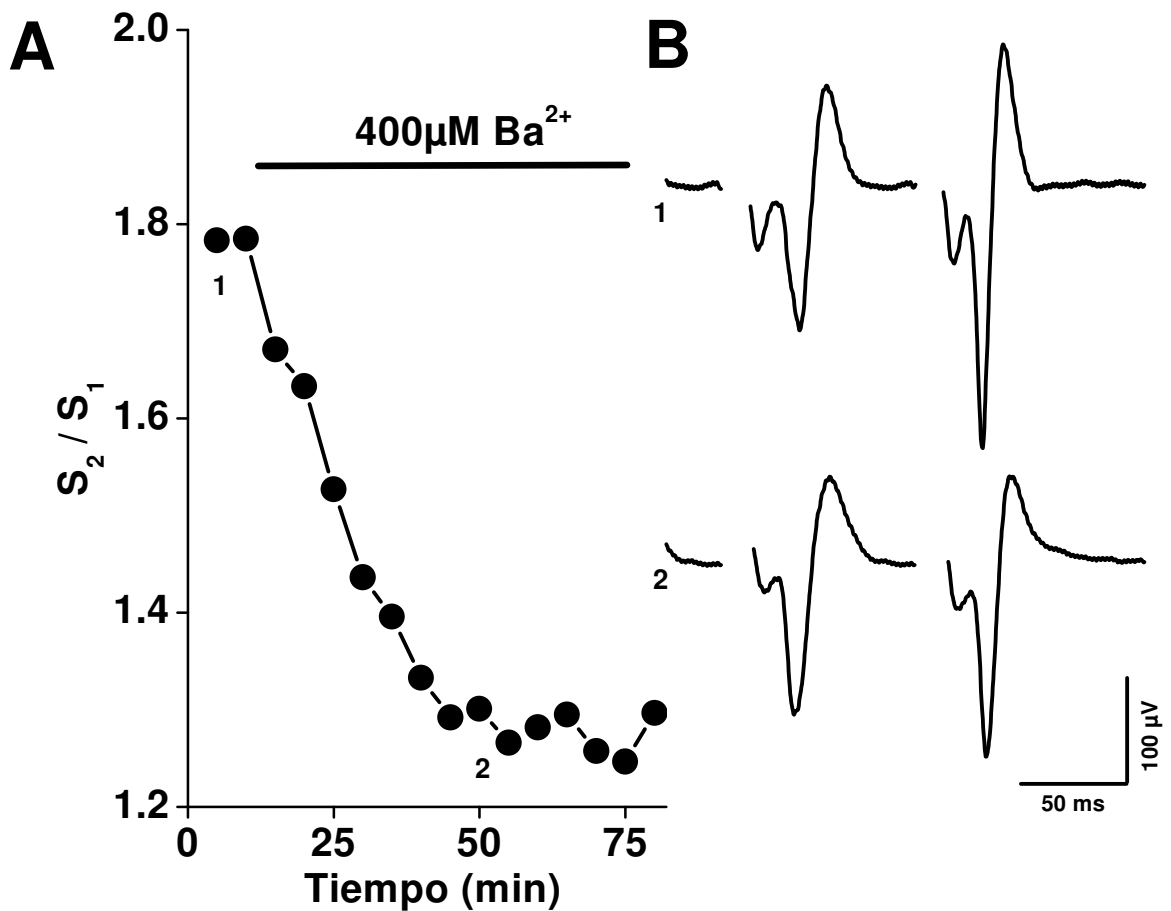


Figura 11. Efecto del bloqueo con bario (400 μM). En A) Curso temporal de la aplicación de bario, la barra nos indica el tiempo en el que fue expuesto el registro al bario, los números representan puntos que fueron tomados para representarlos en B, se puede observar la disminución de la relación s_2/s_1 después de la aplicación de bario, a través del curso temporal del experimento. B) Registros representativos de los puntos señalados: (1) control; (2) efecto de bario. Este bloqueador afectó en un $-52.73 \pm 17.75 \%$ en la PPF de los registros $N = 10$.

cano a 3, este numero nos esta sugiriendo que probablemente hay más de un tipo de canales de potasio que son sensibles a este agente y que están participando en la modulación de la liberación

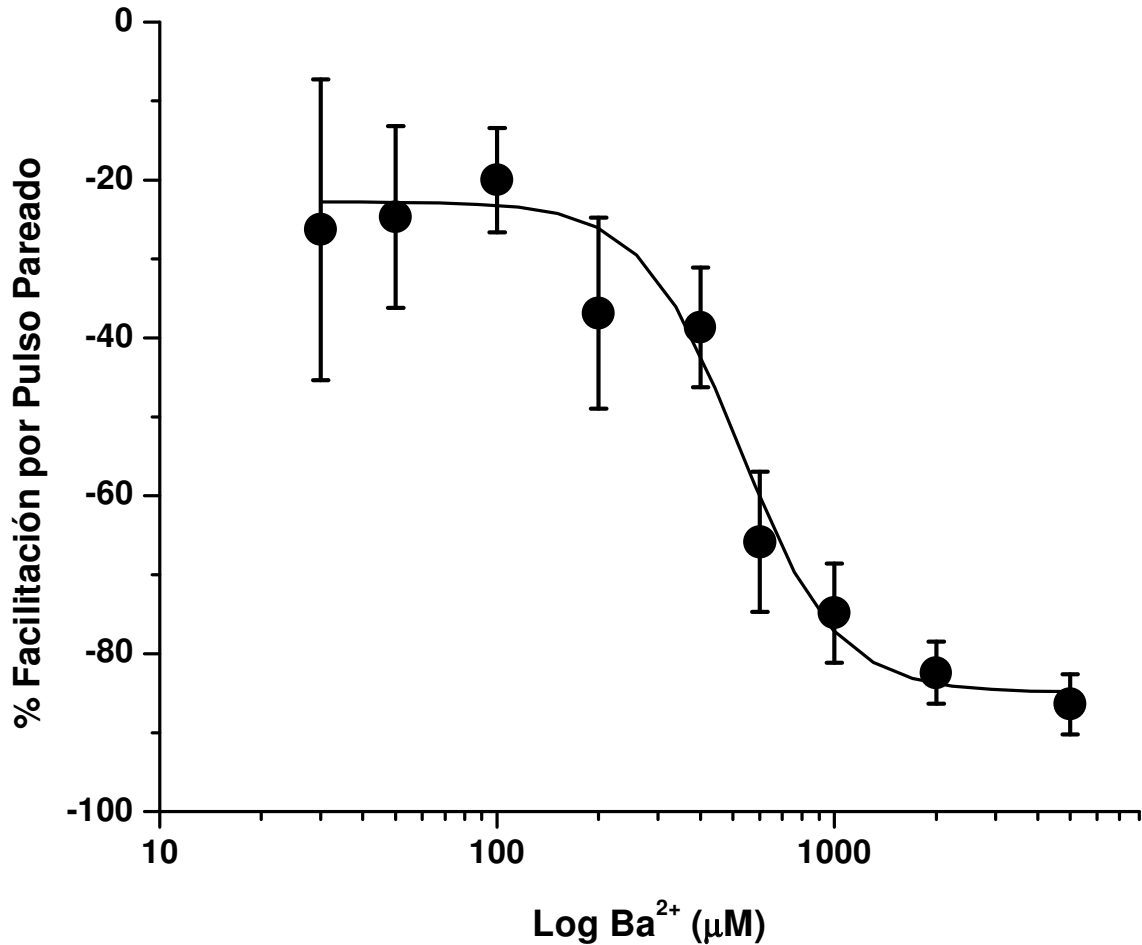


Figura 12. Curva Dosis Respuesta de bario. Relación dosis respuesta para bario en PPF. Se observa que el efecto de bario con respecto a la facilitación por pulso pareado es una relación dosis dependiente. A concentraciones más altas, ocurre un mayor bloqueo por lo tanto la facilitación por pulso pareado disminuye; a menos concentración hay menor bloqueo. De esta curva se obtuvo la dosis efectiva media para bario (521.955 μM); también se obtuvo el coeficiente de Hill cercano a 3, este número nos indica que posiblemente haya más de 3 canales diferentes sensibles a este agente bloqueador que estén participando en esta sinapsis.

EFEECTO DEL BLOQUEO CON CESIO 5 mM

Con el fin de excluir la participación de los canales rectificadores entrantes utilizamos cesio. El cesio como se puede observar en la tabla de bloqueadores de canales de potasio, actúa tanto intracelular como extracelularmente. En la figura 13 podemos observar un experimento representativo del bloque con cesio. La

grafica en A muestra el curso temporal del experimento, la barra nos indica el tiempo de exposición al agente bloqueador, los números nos indican puntos que fueron seleccionados para ser representados en B. En la figura notamos los cambios de la relación de las amplitudes de las respuestas (S_2/S_1), con respecto a los controles. Sin embargo se observa que este bloqueador comienza a tener efecto más de 40 minutos después de su aplicación, esto sugiere que probablemente el cesio se está internalizando a la terminal sináptica y esta bloqueando por el lado citoplasmático.

El máximo efecto que obtuvimos con este agente se observó a los 90 minutos después de su aplicación. Este agente tuvo un efecto negativo sobre la facilitación por pulso pareado, siendo de -62.07 ± 5.07 %; (Mediana -56.73 %; $n = 9$, $p < .0001$; U de Mann-Whitney), con respecto a los controles. En la figura 13B se observan trazos representativos del experimento. En ésta se observa que partimos de una gran facilitación y con cesio obtenemos una gran depresión.

Debido a que el cesio tarda mucho tiempo en hacer su efecto lo que sugiere su internalización y bloqueo por el lado citoplasmático de los canales de potasio en la terminal, se decidió no hacer la curva dosis respuesta de este bloqueador.

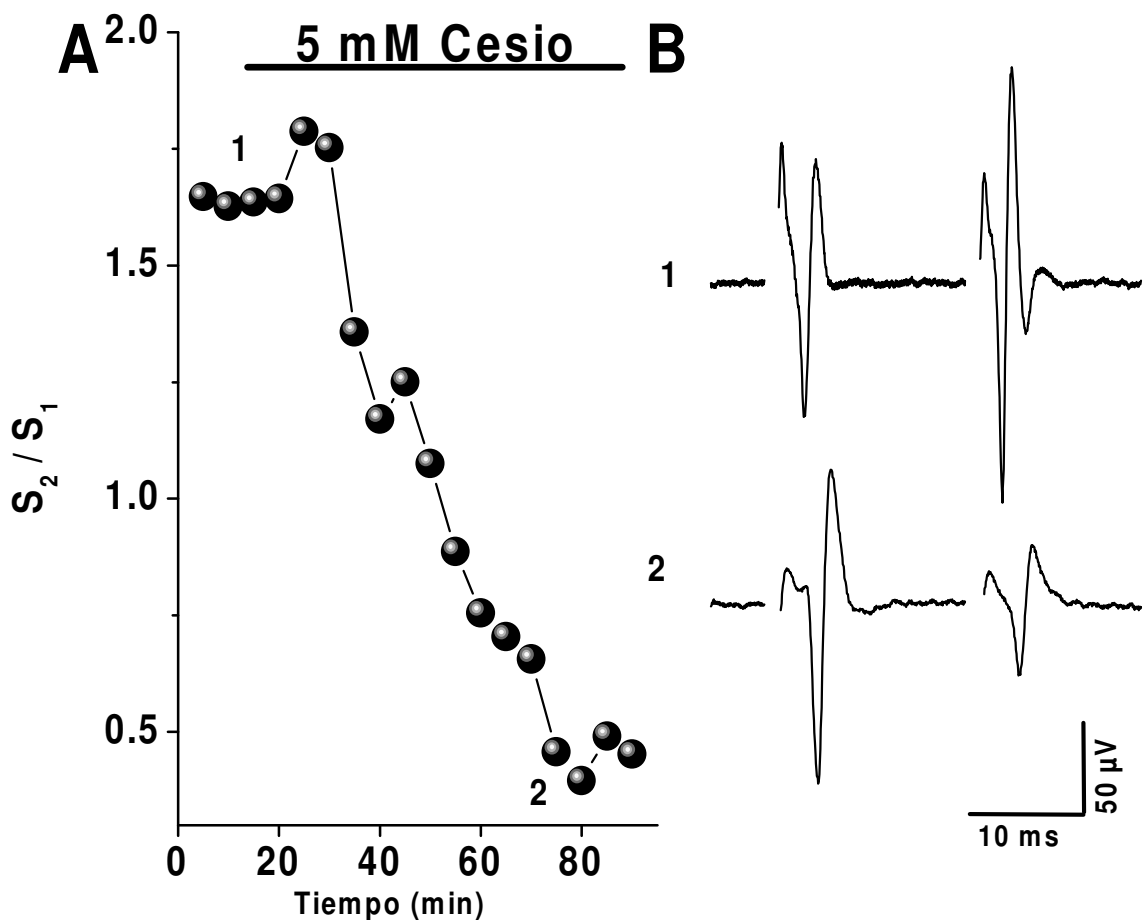


Figura 13 -Efecto del bloqueo con cesio (5 mM). EN A) Curso temporal de la aplicación cesio. Los números nos indican puntos que fueron tomados para representarlos en B. Se observa que este bloqueador tarda mucho tiempo en hacer efecto en comparación con otros fármacos, lo que nos está sugiriendo que se está internalizando y bloquea por el lado citoplásmico. b) registros representativos de los puntos señalados.

EFFECTO DEL BLOQUEO CON 4-AMINOPIRIDINA

Para discriminar la participación de los canales de potasio dependientes de calcio y a la corriente de potasio tipo "A" (transitoria rápida), se decidió utilizar 4-AP, ya que los canales K_A son muy sensibles a este agente. Como se puede observar en la figura 14 donde se muestra un experimento representativo del

efecto de la aplicación de 4-AP. En la figura se puede apreciar el curso temporal de un experimento representativo. La barra nos indica el tiempo de exposición al bloqueador, llegando a su máximo 15 minutos después de su aplicación. Los números nos indican puntos del experimento que fueron tomados para ser representados en B. Se observa que con la aplicación de este agente bloqueador disminuye la facilitación por pulso pareado en un 90.12 ± 1.75 % (mediana: 90.52%; $n = 5$; $p < 0.01$; U de Mann de Whitney), con respecto a los controles. En la figura se observa que aparte de disminuir la facilitación por pulso pareado, las amplitudes de los componentes S_2/S_1 crecen considerablemente, lo que sugiere que aumenta la liberación de neurotransmisor.

CURVA DOSIS RESPUESTA DE 4-AMINOPIRIDINA.

Con el fin de conocer cual es la dosis efectiva media del efecto del bloqueo con 4-aminopiridina sobre la facilitación por pulso pareado utilizamos diferentes concentraciones de este agente bloqueador (30 μ M -1mM). En la figura 15 se muestra el efecto del bloqueo con 4-AP a diferentes concentraciones, observamos que la relación de las dosis sobre la facilitación por pulso pareado es dependiente de la concentración que utilizemos. El efecto mayor que obtuvimos fue con 1 mM el cual ocluye cerca de un 90.12 ± 1.75 % de la respuesta (Mediana: 90.52%; $n = 5$, $p < 0.01$; U de Mann de Whitney). La dosis efectiva media que obtuvimos fue de 0.5 mM y también el coeficiente de Hill que fue de 1.76, este número nos indica que posiblemente hay cerca de dos canales de potasio que son sensibles a este

bloqueador y que son sensibles a este bloqueador. Y que están participando el estas terminales sinápticas.

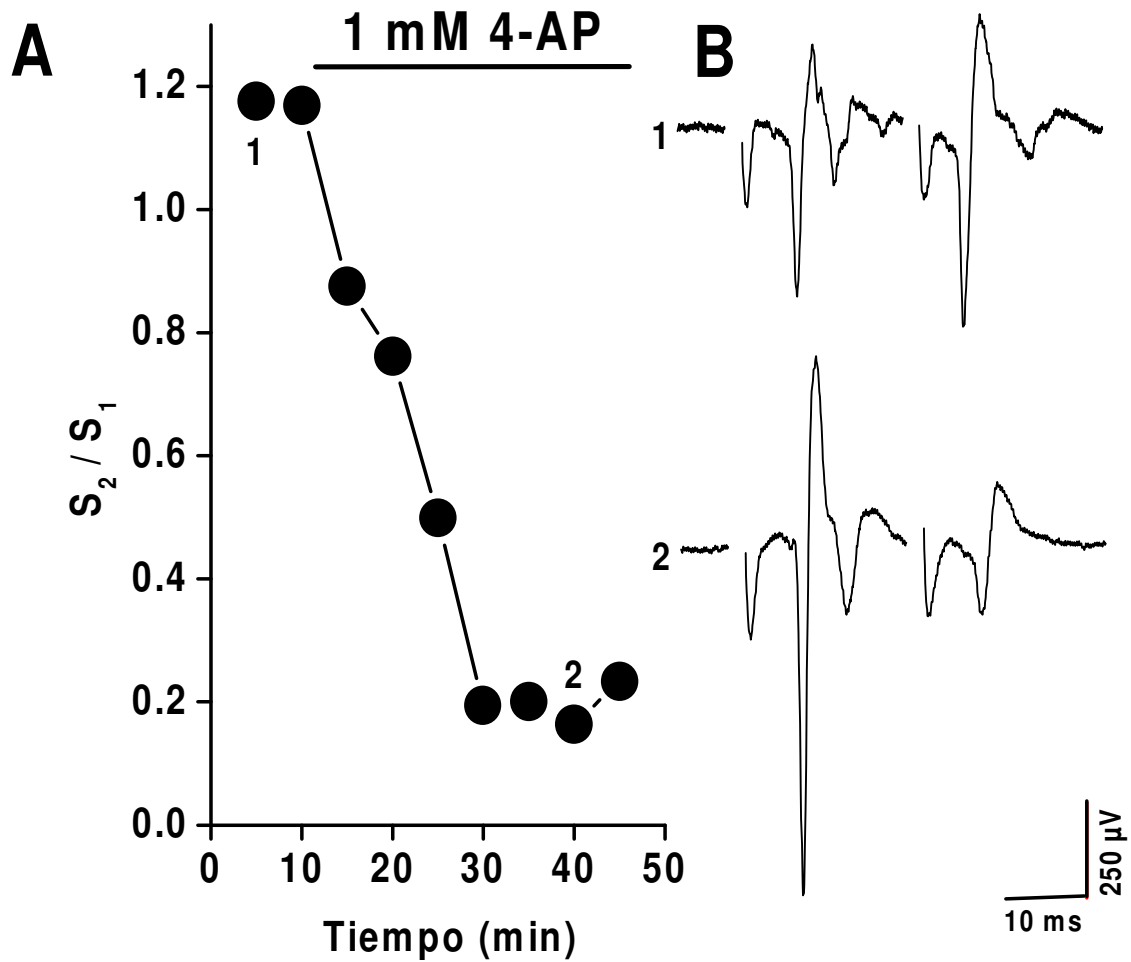


Figura 14. Efecto del bloqueo con 4-Aminopiridina. (1 mM). En A) Curso temporal de la aplicación 4-AP. La barra nos indica el tiempo de exposición al agente bloqueador, Los números nos indican puntos que fueron tomados para ser representados. En B, se observa una disminución de la facilitación por pulso pareado. b) Registros representativos de los puntos señalados.

Todos estos resultados hasta ahora mostrados, nos muestran que el efecto de los diferentes agentes bloqueadores utilizados en este trabajo producen una disminu-

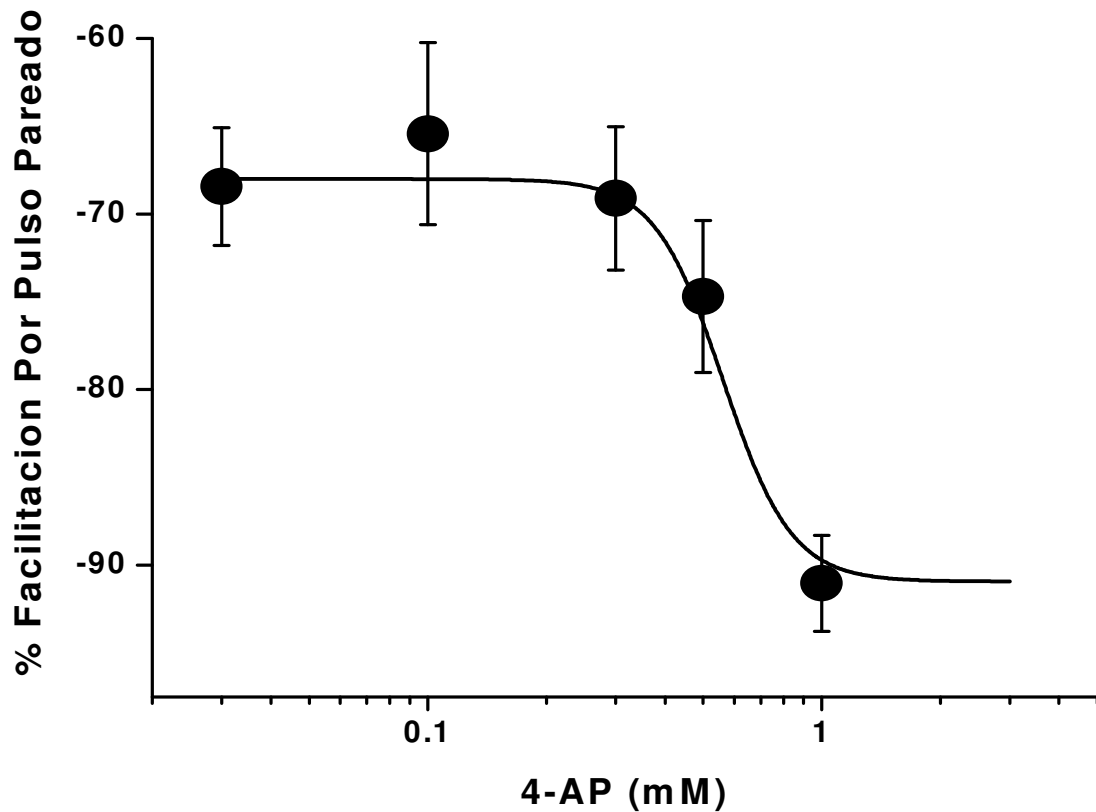


Figura 15. Curva dosis respuesta de la aplicación de 4AP. La relación de la aplicación de 4-AP a diferentes dosis es una relación dependiente de la concentración, ya que a más concentración el bloqueo es mayor.

ción de la facilitación por pulso pareado (Bario) o una depresión por pulso pareado (TEA, Cesio, 4-AP), lo que esta sugiriendo que los canales de potasio sensibles a

estos agentes han sido bloqueados. Como se sabe los canales de potasio, participan en la repolarización de la membrana en la terminal sináptica, al estar bloqueados estos canales la terminal sináptica permanece más tiempo despolarizada, lo que ocasiona que los canales de calcio dependientes de voltaje permanezcan más tiempo abiertos, permitiendo una mayor entrada de calcio a la terminal sináptica permite que las vesículas que se encuentran disponibles para ser liberadas se fusionen y produzcan una mayor liberación del neurotransmisor al espacio sináptico, con el protocolo que nosotros utilizamos lo vemos como depresión por pulso pareado (Barral et al, 2001).

DISCUSIÓN.

Debido a que los canales de potasio son muy importantes, pues como ya se ha mencionado participan en varias funciones celulares y neuronales, además de que están involucrados en varias enfermedades, tales como: Ataxia episódica (tipo 1), epilepsia neonatal benigna, distrofia miotónica muscular, síndrome QT largo, Síndrome de Batter's, Hipoglucemia de la infancia, hiper-insulemia persistente en la familia, entre otras. En este trabajo nos enfocamos a ver que tipo de canales de potasio están participando en la modulación de la liberación del neurotransmisor, en la sinapsis cortico-estriatal de la rata; donde se confirma la modulación presináptica producida por el bloqueo de los canales de potasio mediante su oclusión farmacológica, pues con la aplicación de los bloqueadores no específicos de los canales de potasio observamos una disminución de la facilitación por pulso pareado; lo que significa que al estar bloqueados los canales de potasio facilitan la liberación del neurotransmisor, indicándonos que diferentes tipos de canales de potasio están presentes en las terminales glutamatérgicas. Como resultado de las diversas funciones que se llevan a cabo a través de la activación de los canales de potasio, estos canales juegan un papel crítico en la regulación de la liberación del transmisor (Gribkoff, et al, 2001).

CANALES DE POTASIO BLOQUEADOS POR TEA.

El clásico bloqueador de canales de potasio es el TEA, es usado ampliamente como una molécula externa o interna para la boca del poro de los canales de potasio dependientes de voltaje, actúa fisiológicamente bloqueando la

vía de permeación iónica, no dejando pasar iones potasio a través del poro (Heginbotham y MacKinnon, 1992; Crouzy et al., 2001). Muchas de las conductancias de potasio son bloqueadas por este bloqueador no específico de canales de potasio TEA (Faber y Sah, 2000; Xu, et al, 2001; Tan y Llano, 1999). Los canales de potasio sensibles a TEA entran en dos categorías, cuando actúa externamente, los que son altamente sensibles ($K_i < 1$ mM; Hille, 1967) y los que son relativamente insensibles ($K_i > 20$ mM; Armstrong y Binstock, 1965). También se ha visto que el efecto del agente bloqueador TEA difiere cuando se aplica internamente ó externamente pues se han sugerido dos sitios de unión (Armstrong y Hille, 1972; Hille, 1992), su aplicación externa bloquea algunas de las corrientes de potasio (Stanfield, 1983), su aplicación interna es menos específica y usualmente menos potente.

Hay dos tipos de canales de potasio activados por calcio los BK_{Ca} y SK_{Ca} . Los canales BK_{Ca} son bloqueados selectivamente por Iberotoxina, sin embargo el TEA también bloquea a los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} cuando se aplica extracelulármente (Meir, et al., 1999), aunque los canales BK_{Ca} parecen ser más sensibles a la aplicación interna de TEA que los canales SK_{Ca} . La alta sensibilidad de los BK_{Ca} hacia el TEA consiste en la presencia de un residuo aromático en la boca del poro en este canal (MacKinnon y Yellen, 1990; MacKinnon y Heginbotham, 1992). Los canales de potasio rectificadores entrantes y retardados también son sensibles al TEA extracelular (Nicholls, et al, 1990; Meir, et al, 1999). Sin embargo, a concentraciones de entre 0.3 y 1 mM, el TEA bloquea

preferencialmente a las conductancias BK (Faber y Sah, 2002; Xu, et al, 2001; Tan y Llano, 1999).a estas concentraciones el TEA decrece la relación por pulso pareado sugiriendo que los canales de potasio BK están presentes en las terminales glutamatérgicas cortico-estriatales (Raffaelli, et al, 2004; Faber y Sah, 2002; Xu, et al, 2001; Tan y Llano, 1999)

Los canales de potasio tipo A transitorios, generalmente exhiben una baja sensibilidad al TEA externo. Como consecuencia bajas concentraciones de TEA son usadas rutinariamente para identificar corrientes de potasio tipo A (I_A) de otras corrientes de potasio, tales como rectificadores retardados (Denton y Leiter, 2002). Sin embargo, se ha visto que la corriente A es sensible a TEA a concentraciones bajas de 1-2 mM (Thorn, et al., 1991).

Altas concentraciones de TEA (10-20 mM) bloquea muchos tipos de canales de potasio que son dependientes de voltaje (rectificadores retardados, Coetzee, et al, 1999; Ishikawa, et al, 1996) inhibe al Kv 3.1 a bajas concentraciones (2mM) (Wang, 1998). Los resultados nos sugieren que un tipo de rectificador retardado esta participando en la modulación de la liberación de neurotransmisor en esta sinapsis. A estas concentraciones el TEA tiene efectos postsinápticos y lo podemos observar como un cambio en las amplitudes de los picos poblacionales (Coetzee, et al, 1999). En este trabajo encontramos que TEA 20 mM disminuyo la facilitación por pulso pareado en un -32.11 ± 15.28 %; Mediana = 22.46%; n = 6 ($p < 0.05$; U de Mann Whitney) con respecto a los controles

CANALES DE POTASIO BLOQUEADOS POR BARIO Y CESIO.

En general todos los canales de potasio se bloquean extracelularmente por la aplicación de bario y cesio excepto la corriente tipo A (Castle et al., 1989), sin embargo hay algunos reportes de que algunos tipos de canales de potasio son relativamente insensibles al bario y cesio (Edwards y Weston, 1994). Los canales de potasio rectificadores entrantes (K_{IR}) son bloqueados por bario y cesio externo, pero las propiedades del bloqueo difieren entre los diferentes tipos de canales (Bertrand, et al, 2003). En efecto, el bario puede bloquear varias conductancias de potasio, como aquellas que se bloquean en la hiperpolarización (rectificadores entrantes o GIRK) o en la despolarización (Rectificadores retardados) (Bertrand, et al, 2003; Hille, 2001; Coetzee, et al, 1999). Los canales rectificadores entrantes son inhibidos por 300 μ M de bario (De Boock, 2003). En el presente trabajo se pudo observar un bloqueo significativo de los canales de potasio cuando se utilizó bario (400 μ M) pues produjo una disminución de la FPP de 53.43 ± 8.57 % (mediana 52.74, n= 10, p <; U de Mann-Whitney). Sin embargo, cuando aplicamos cesio observamos que tarda mucho tiempo en hacer su efecto, lo que sugiere que se internaliza y esta bloqueando por el lado citoplásmico, descartando la participación de los canales rectificadores retardados, pues la aplicación de cesio (5 mM) produjo una disminución en la FPP de -67.11 ± 5.16 %;(p <; U de Mann-Whitney). Esto hizo necesario realizar otras pruebas de oclusión farmacológica para comprobar que hay una participación de los canales rectificadores retardados.

CANALES DE POTASIO BLOQUEADOS POR 4-AMINOPIRIDINA

La corriente A que es poco sensible al bloqueo por TEA, aunque se sabe que es muy sensible a la 4-AP (Gandhi Y Matzel, 2000) más que los rectificadores retardados (Hille, 2001). Los canales de potasio dependientes de voltaje que median el postpotencial hiperpolarizante rápido son sensibles a 4-AP (100 μ M) (Faber y Sah, 2000, Shen Y Jhonson, 2002). Las corrientes de potasio sensibles a 4-AP se activan durante potenciales de acción y contribuyen al postpotencial hiperpolarizante rápido. La 4-AP cuando aplicado *in vitro* produce actividad epileptiforme así como una reducción en la facilitación por pulso pareado (Peña, et al, 2002). En este trabajo, la 4-AP fue el bloqueador que actúo más rápido, asimismo fué el que tuvo el mayor efecto, pués produjo una disminución en la FPP 90.12 ± 1.75 (Mediana: 90.52%; n= 5, $p < 0.01$; U de Mann de Whitney). Reforzando la idea de que se trata de una corriente transitoria rápida (Figura 16).

CONCLUSIONES

Los datos derivados del presente trabajo sugieren que cuando bloqueamos a los canales de potasio que se encuentran en las terminales glutamatergicas que llegan al estriado, produce una disminución en la facilitación por pulso pareado, o bien depresión por pulso pareado, esto sucede porque al estar bloqueados estos canales en la terminal sináptica, esta permanece más tiempo despolarizada, provocando que los canales de calcio dependientes de voltaje se abran y entre más calcio a la terminal. Como hemos visto el calcio es fundamental para que haya liberación de neurotransmisor, ya que permite que las vesículas que contienen neurotransmisor, se fusionen a la membrana de la neurona y pueda ser liberado el neurotransmisor.

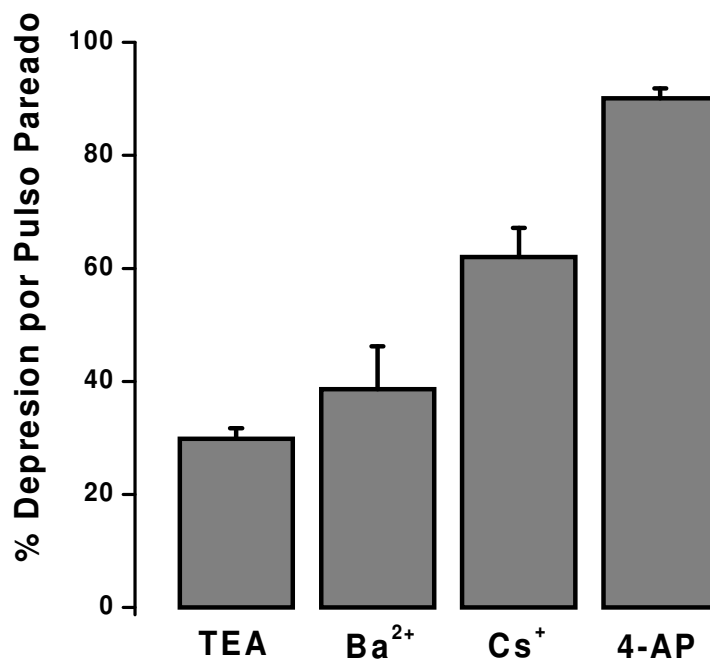


Figura 16. Valores de depresión por pulso pareado. En la figura se puede observar que se obtuvo una baja sensibilidad a los agentes bloqueadores TEA y bario, como ya se mencionó el cesio tarda mucho tiempo en hacer su efecto y hay una alta sensibilidad a la 4-AP.

En este trabajo se encontró que hay una baja sensibilidad al TEA, existe una sensibilidad moderada al bario. Mientras que el cesio tardó mucho tiempo en hacer su efecto, lo que sugiere su internalización, bloqueando a los canales por el lado citoplasmático. Como se puede apreciar en la figura 16.

Basándonos en la farmacología de los canales de potasio en cuanto a la sensibilidad que tienen estos para poder ser bloqueados por los diferentes bloqueadores que se utilizaron en este trabajo se puede proponer que al menos uno de los canales de potasio que está modulando la liberación de glutamato en la sinapsis cortico-estriatal es un canal dependiente de voltaje, probablemente se trate del canal Kv 1.4 (Coetzee et al, 1996; Hille, 2001).

LITERATURA CITADA

- 1.- Afifi KA, y Bergman RA. 1999. Neuroanatomía Funcional. Mc Graw-Hill Interamericana. (720pp).
- 2.- Armstrong CM y Binstock L .1965. The selective inhibition of delayed potassium channels of giant axons. J. Gen. Physiol. 58: 413-437.
- 3.- Armstrong CM y Hille B .1972. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. J. Gen. Physiol. 59:388-400
- 4.- Armstrong CM y Loboda A. 2001. A model for 4-Aminopiridine action on K channels; similarities to Tetraethyl ammonium ion conduction. Biophysical Journal. 81 (895-904).
- 5.- Andrew ED y Dudek FE. 1985. Spike broadening in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamic slices. Brain Res.334: 176-179
- 6.- Bargas J, Ayala GX, Hernández E. y Galarraga E. 1998^b. Ca²⁺ -Channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. Brain Res. Bull. 45:521-524.
- 7.- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E. 1999. Ca²⁺ activated outward currents in neostriatal neurons. Neuroscience 88(2) 479-488.
- 8.- Bargas JE. Galarraga y J. Aceves. 1998^a. Los ganglios basales. En: Fisiología, células, órganos y sistemas. Vol. 5 Cap X.13. Muñoz EJ. y García X. (Eds). FCE México. (257-273).
- 9.- Barral J, Mendoza E, Galarraga E, Bargas J. 2003.The presynaptic modulation of cortico-estriatal afferents by m-opioids is mediated by K⁺ conductances. Eur J Pharmacol 462: 91-98.
- 10.- Barral, J. 2001. Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatergicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. UNAM. FES. Iztcala. México DF. Pp 82.
- 11.- Bertrand S, Nouel D, Morin F, Nagy F, Lacaille, JC. 2003. Gabapentin actions on Kir3 y N-Type Ca²⁺ Channels via GABA_B receptors in hipocampal pyramidal cells.
- 12.- Bielefield T, Rotter JL, Jackson MB. 1992. Three potassium channels in rat posterior pituitary nerve terminal. J. Physiol (London) 458: 41-67

- 13.- Bond CT; Maylie J; Adelman JP. 1999. Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Ann NY Acad Sci* 30: 868,370378
- 14.- Brodal P. 1992. The central Nervous system. Structure and function. Oxford University Press. N.Y. pp 246-261.
- 15.- Cardinalli DP. 1992. Manual de Neurofisiología. Ediciones Díaz de Santos
- 16.- Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH. 1989. Toxin in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci* 12 (2): 59-65
- 17.- Char-chang S. 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*. 52(4): 557-593.
- 18.- Charlton MP, Smith SJ y Zucker RS. 1982. Role of presynaptic calcium ions and channels in synaptic facilitation and depression at the squid giant synapse. *J. Physiol.* 323:173-193
- 19.- Choe S. 2002. Potassium Channels Structures. *Neuroscience*. 3:115-121.
- 20.- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. 1991. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci*. 88 pp 5092-5095.
- 21.- Cingolani He, Houssay AB. 1988. Fisiología Humana. 5ta impresión. El ateneo.
- 22.- Coetzee WA; Amarillo Y; Chiu J; Chow A; Lau D; MacCormack T; Moreno H; Nadal MS; Ozaita A; Pountney D; Saganich M; Vega-Saenz de Miera E; Rudy B. 1996. Molecular diversity of potassium channels. *Ann N Y Acad Sci*. 30 (868) 233-285.
- 23.- Crouzy S, Berneche S, Roux B. 2001. Extracellular blockade of K⁺ channels by TEA: results from molecular dynamics simulation of the KcsA channel. *J Gen Physiol* 118 (207-217).
- 24.- Curran ME. 1998. Potassium ion channels and human disease; phenotypes to drug targets. *Current opinion in Biotechnology*. 9: 565-572.
- 25.- Daniel W. 2002. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta Ed Limusa Wyley. Mexico. Pp 925
- 26.- Debanne D, Guérineau MC, Gähwiler BH y Thompson SM. 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release *J. Physiol. Lond.* 491:163-176.

- 27.- Debock F, Kurtz J, Azad JC, Parson CG, Hapfelmeier G, Zieglgansberger W, Rammes G. 2003. α_2 -adrenoreceptor activation inhibits LTP y LTD in the basolateral amygdala: involvement of $G_{i/o}$ -protein-mediated modulation of Ca^{2+} -channels and inwardly rectifying K^+ channels in LTD. European Journal of Neuroscience. (17) 1411-1424.
- 28.- Del-Castillo J y Katz B. 1954a. Quantal components of the end-plate potential. J. Physiol. 124:560-573
- 29.- Del-Castillo J y Katz B. 1954b. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. J. Physiol. 124:574-585
- 30.- Denton JS, and Leiter JC. 2002. Anomalous effects of external TEA on permeation and gating of A-type potassium current in *H. aspersa* neuronal somata. J. Membrane Biol. 190, 17-28.
- 31.- Di-Figlia M y Aronin N. 1982. Ultrastructural features of immunoreactive somatostatin neurons in the rat caudate nucleus. J. Neurosci. 2:1267-1274.
- 32.- Dodson PD, Forsythe ID. Presynaptic K^+ Channels; electrifying regulators of synaptical terminal excitability. Trends in Neuroscience 27 (4).
- 33.- Doyle DA; Cabral JM; Pfuetzner RA; Kuo A; Gulbis JM; Cohen SL; Chait BT; and Mackinnon R. 1998. The structure of the potassium channels: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. Science. 280 69-77
- 34.- Edwards G y Weston AH. 1994. Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. In: Handbook of experimental pharmacology. (Vol. 111) Szekeres and JC Papp. Eds) Pp 469-531. Springer-Verlag. Berlin.
- 35.- Faber ESL y Sah P. 2000. The effect of a 4-AP sensitive potassium current on neurones of the rat lateral amygdala. Soc Neurosci Abstr 26: 897.
- 36.- Flores-Hernández J, Galarraga E, y Bargas J. 1997. Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. Synapse. 25: 185-195.
- 37.- Gabel LA, Nisenbaum ES. 1998. Biophysical characterization and functional consequences of slowly inactivating potassium current in neostriatal neurons. J Neurophysiology 79 (1989-2002).

- 38.- Gandhi CC, Matzel LD. 2000. Modulation of presynaptic action potential Kinetics underlies synaptic facilitation of type B photoreceptors after associative conditioning in *Hemissenda*. J Neuroscience 20(5) 2022-2035.
- 39.- Graybiel AM. 1990. The basal ganglia and the initiation of the movement. Rev. Neurol. (Paris) 146:570-574.
- 40.- Gribbkoff VK, Starrett JE, Dworetzky SI. 2001. Maxi K potassium channels; form, function, and modulation of endogenous regulators of intracellular calcium. The Neuroscientist 7(2) 166-178.
- 41.- Grippo J y Grippo T. 2001. Chanelopathies in Neurology. Rev Neurology. 1-15, 33(7) 643-647.
- 42.- Hammond C. 2001. Cellular and molecular neurobiology. Academic Press. N.Y. pp 188-214.
- 43.- Heginbotham L y MacKinnon R. 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. Neuron. 8:483-491.
- 44.- Hernández-Echeagaray E, Galarraga E y Bargas J. 1998. 3- α -chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. Neuropharmacol. 37:1493-1502.
- 45.- Hille B. 1967. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. J. Gen. Physiol. 50:1287-1302.
- 46.- Hille B. 2001. Ion channels of excitable Membranes. Third edition. Sinauer associates INC publisher.
- 47.- Ishikawa T, Nakamura Y, Saitoh N, Li WB, Iwasaki S, Takahashi T. 2003. Distinct roles of Kv1 and Kv3 potassium channels at the calyx of held presynaptic terminal. Journal of Neuroscience 23 (32) 10445-10453.
- 48.- Jarolimek V. Bäurle J. Misgeld U. 1998. Pore mutation in a G-protein- gated Inwardly rectifying K⁺ channel subunit causes loss of K⁺ -dependent inhibition in weaver Hippocampus. Journal of Neuroscience. 18 (11) 4001-4007.
- 49.- Johnston D. y Wu SM. 1995. Foundations of cellular neurobiology. MIT Press. Cambridge. Mass. pp 287-391
- 50.- Jones, SPV. 1997. Gradual modulation of an Inwardly rectifying potassium conductance. Neuropharmacology 36(2): 209-215

- 51.- Kaczorowsky GJ. García ML. 1999. Pharmacology of voltage-gated and calcium activated potassium channels *Chemical biology* 3: 448-458.
- 52.- Kamermans M y Fahrenfort I. 2004. Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 14(5): 531-41.
- 53.- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. 2000. *Principles of Neural Science*. 4a Ed. McGraw-Hill USA. pp 175-298.
- 54.- Katz B. 1966. *Nerve, muscle and synapses*. McGraw-Hill. N.Y. pp.97-110.
- 55.- Katz B. y Miledi R. 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol. (London)* 207: 789-801.
- 56.- Kawaguchi T. 1993. Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13: 4908-4923.
- 57.- Kita T; Kita H; Kitai ST. 1985. Effects of 4-aminopyridine (4-ap) on rat Neostriatal Neurons in an *IN VIVO* slice preparation. *Brain Research* 361(10-18).
- 58.- Kita, H. 1993. The GABAergic circuits of the striatum. *Prog. Brain Res.* 99:51-72
- 59.- Lovinger DM. y Tyler E. 1996. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. *Int. Rev. Neurobiology.* 39:77-111
- 60.- MacKinnon R y Yellen G. 1990. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science.* 250:276-279.
- 61.- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S, Rahamimoff R. 1999. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.* 79, 1019-1088
- 62.- Miller RJ. 1998. Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:201-227.
- 63.- Misgeld U, Okada Y, Hassler R. 1979. Locally evoked potentials in slices of rat neostriatum: A tool for the investigation of intrinsic excitatory processes. *Exp. Brain Res.* 34:575-590..

- 64.- Nicholls CG y Lopatin AN. 1997 Inward Rectifier Potassium Channels. *Ann. Rev. Physiol.* 59:171-191.
- 65.- Nisembaum ES, Wilson CJ, Foehring RC, Surmeier DJ. 1996. Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 76(2) 1180-1194.
- 66.- Nisembaum ES, Wilson CJ. 1995. Potassium current responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *Journal of neuroscience.* 15 (6) 4449-4463.
- 67.- Parent A y Hazrati LN. 1995^a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev.* 20(1):91-127.
- 68.- Parent A y Hazrati LN. 1995^b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev.* 20(1):128-154.
- 69.- Peña F, Bargas J, Tapia R. 2002. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *J Neuropharmacol.* 42 (807-812)
- 70.- Phil. C. Biggin; Tarmo, Roosild; Senyon C. 2000. Potassium channel structure: domain by domain. *Structural biology.* 10: 456-461 *Physiology.* Fourth Edition. Willy-liss Publication
- 71.- Quiang J y Saggau P. 1999. Activity-dependent modulation of K⁺ currents at presynaptic terminals of mammalian central synapses.
- 72.- Raffaelli
- 73.- Reimann F y Ashcrof. 1999. Inwardly rectifying potassium channels. *Cell biology.* 11: 503-508.
- 74.- Rutecki PA, Lebeda FJ, Jhonston. D. 1990. Epyleptiform activity in the hippocampus produced by tetraethyl ammonium. *J. Neurophysiol.* Oct 64(4) 1077-88.
- 75.- Shepherd G.M. y C. Koch. 1998. Introduction to synaptic circuits. En: Shepherd G. M. (Ed) *The synaptic organization of the brain.* 4^a Ed. Oxford University Press pp 1-36.

- 76.- Shen KZ y Johnson SW. 2002. Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioids receptor in rat subthalamic nucleus in vitro. *J Physiol*, 541 (pt1) 219-230.
- 77.- Simon AM. y Goudenough DA. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in Cell Biology*. 8:477-483.
- 78.- Smith Y, Devan MD; Shink E, Bolam JP. 1998. Microcircuits of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- 79.- Smith-Nielsen T. 1997. *Animal physiology. Adaptation and environment*. Fifth Edition. Cambridge University press.
- 80.- Stanfield PR. 1983. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 97:1-67
- 81.- Taglialatela M, Drewe JA, Brown AM.1993. Barium Blockade of clonal potassium channel and its regulation by a critical pore residue: *Mol pharmacol*, Jul, 44(1): 180-90
- 82.- Takagi H, Somogyi P, Somogyi P y Smith AD. 1983. Fine structural studies of a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum: A correlated light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 214:1-16.
- 83.- Takako O-S, Kim I, Sawada S, Yamamoto C. 1996. Presence of the voltage-gated potassium channels sensitive to tetrodotoxin inhibitory presynaptic terminals of cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 207 (195-198).
- 84.- Tan YP y Llano I. 1999. Modulation by K⁺ channels of action potential-evoked intracellular Ca²⁺ concentration rises in rat cerebellar basket cell axons. *Journal of physiology* 520 (1) 65-78.
- 85.- Thorn PJ, Wang XM, Lemos JR. 1991. A fast, transient K⁺ current in neurohipophysial nerve terminal of rat. *J Neurophysiol.*432
- 86.- Walmsley B, Álvarez FJ y Fyffe REW. 1998. Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *TINS* 21:81-88.

- 87.- Wang H, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, Mckinnon D. 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channels subunits: Molecular correlates of the M-channel. *Science*. 282: 1890-1983
- 88.- Wilson C. 1998. The Basal Ganglia. In: Shepherd, G.M. (Ed) *The synaptic organization of the brain*. 4^a Ed. Oxford University press. N.Y. pp 329-375.
- 89.- Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. 2001. Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv 1.4 potassium channels by a voltage dependent oxidative mechanism. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 299(1) 227-237.
- 90.- Zimmermann H. 1993. *Synaptic transmission, cellular and molecular basis*. Oxford University Press. N.Y. pp 111-117