



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**MODULACIÓN PRESINÁPTICA EN EL  
*Paleostriatum augmentatum* DE LA  
TORTUGA POR LA ACTIVACIÓN DE  
RECEPTORES GABAérgicos**

**T E S I S**

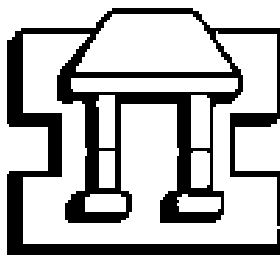
Que para obtener el Título de

***B I Ó L O G O***

Presenta

**LEÓN EDUARDO SÁNCHEZ-MEJORADA  
ZÚÑIGA**

**ASESOR: Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México.  
2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero (IN200703, IN204407).

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto Neurociencias** en la **Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE)** de la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** durante el periodo comprendido de Agosto de 2005 a Abril de 2007.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del

**Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero.**

**Proyecto Neurociencias, UIICSE. FES Iztacala, UNAM.**

### A mi Papá

Gracias por haberme enseñado a que todo se puede lograr en esta vida, no importa que tan difícil sea, o que tan lejos se vea nuestro objetivo. Siempre habrá un camino o una forma que nos lleve a esa meta. Agradezco tus muestras de cariño y afecto muy a tú manera.

### A mi Mamá

Gracias por enseñarme que con amor, paciencia y con cordura las cosas salen más rápido y mejor, tal y como decía tu papá (o sea mi abuelo), “Lento que tengo prisa”. Te agradezco todos y cada uno de los momentos que he compartido, comparto y compartiré contigo, todas las veces que me ayudaste, me ayudas y me ayudarás. Gracias por ser tú y por existir.

### A mi Hermano

Gracias por ser mi mejor amigo, reír, llorar, pelear, enojarte, etc. a mi lado. No importa que nuestras vidas tomen diferentes caminos y nos tengamos que separar, siempre estaremos juntos y unidos. Espero que como a mí me está sucediendo todos tus sueños y anhelos se hagan realidad.

### A los Patos

Chavi, Cinti, Fátima, Pau, Mariano, Violeta, Alí, Niño. Gracias por haberme aguantado durante toda la carrera, en las prácticas, festejos, etc. Realmente fueron un apoyo muy importante para mí en mi vida tanto personal como académica, no sería lo que soy hoy de no haberlos conocido, me hicieron ver la vida de una manera diferente. Los quiero amig@s.

A mis abuel@s, ti@s, prim@s, y a todos las personas que estuvieron o están conmigo en momentos importantes y no mencioné arriba.

“No hubiera sido nada sin ustedes, ni con toda la gente que estuvo a mi alrededor desde el comienzo, algunos siguen hasta hoy, GRACIAS TOTALES”.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, en especial al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, por guiarme en el mundo de la investigación neurofisiológica, ya que sin su paciencia, su tiempo y sus explicaciones nada de esto hubiera sido posible.

También quiero agradecer a quienes hicieron la revisión tanto del ante proyecto de tesis así como de la tesis ya como tal. Gracias Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, Dra. Bertha Segura Alegría, Dra. Mónica Gonzalez Isais, M. en C. María Eugenia Garín Aguilar, Biol. Hugo Jesús Castro Cortés, y al M. en C. Javier Alonso Trujillo, por haber dedicado tiempo y esfuerzo en la revisión de mi proyecto.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
La transmisión sináptica .....	2
Canales de $Ca^{2+}$ .....	4
<i>El papel del <math>Ca^{2+}</math> en la liberación</i> .....	4
Evolución de los ganglios basales.....	6
Circuito de los ganglios basales .....	8
La evolución de los circuitos sinápticos en los ganglios basales de cordados .....	12
La modulación GABAérgica.....	14
Receptores $GABA_A$ .....	17
Receptores $GABA_B$ .....	18
JUSTIFICACIÓN .....	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	22
OBJETIVOS .....	22
OBJETIVOS GENERALES.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES .....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
Diseción de Tortuga .....	23
El Registro Extracelular de Potenciales de Campo .....	24
Facilitación por Pulso Pareado .....	25
Fármacos utilizados .....	26
Análisis de datos .....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
La sinapsis corticostriatal en la tortuga es glutamatérgica .....	27
La activación de receptores GABAérgicos .....	27
Modulación por Receptores $GABA_A$ .....	28
Modulación por Receptores $GABA_B$ .....	29
El bloqueo con antagonistas específicos (2-OH saclofen) no modifica la respuesta presináptica.....	30
La activación de receptores $GABA_B$ es dependiente de la concentración .....	31
Modulación por Canales de $Ca^{2+}$ .....	33
<i>El bloqueo de canales de <math>Ca^{2+}</math> tipo P/Q no ocluye el efecto del baclofen</i> .....	33
<i>La FPP producida por el baclofen es ocluida casi completamente después de bloquear Canales de <math>Ca^{2+}</math> tipo N.</i> .....	34
DISCUSIÓN.....	35
$GABA_A$ y $GABA_B$ .....	37
Muscimol.....	38
Bicuculina .....	39
<i>La acción del bloqueador específico bicuculina</i> .....	39
Baclofen.....	40
<i>La activación es dependiente de la concentración</i> .....	41
2-OH saclofen.....	41
Los Canales de $Ca^{2+}$ .....	42
$\omega$ -Agatoxina TK.....	43
$\omega$ -Conotoxina GVIA .....	43
CONCLUSIONES.....	46
REFERENCIAS .....	47

## RESUMEN

El presente trabajo fue hecho con la finalidad de contribuir al conocimiento de la acción tanto de los agonistas como de los antagonistas GABAérgicos, así como la forma por la cual los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  modulan presinápticamente las entradas corticostriatales en esta sinapsis.

Las aferentes corticales que proyectan hacia el neostriado de los cordados liberan glutamato, dicha liberación puede ser modulada por diferentes neuromoduladores, como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que actúan bloqueando conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo que el propósito del presente trabajo consiste en determinar la modulación de la liberación de neurotransmisores producida por la activación de receptores GABAérgicos en el *Paleostriatum augmentatum* e identificar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la transmisión glutamatérgica corticostriatal de la tortuga que son modulados por la activación de receptores GABAérgicos. Se obtuvieron registros mediante las técnicas extracelulares de amplificación y registro convencionales en el *Paleostriatum augmentatum* de rebanadas de cerebro de tortuga *Trachemys scripta elegans*, evocados por estimulación cortical. Se utilizó el paradigma experimental de facilitación por pulso pareado (FPP) para establecer el papel de la modulación GABAérgica así que canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que participan en esta modulación. Para ello se aplicaron agonistas y antagonistas GABAérgicos así como toxinas peptídicas específicas para bloquear los diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al igual que en los mamíferos, la aplicación del agonista  $\text{GABA}_A$ , el muscimol (5 mM) incrementó la amplitud de las respuestas  $S_1$  y  $S_2$ , pero sin producir cambios en la FPP, lo que sugiere que los receptores  $\text{GABA}_A$  actúan postsinápticamente; asimismo, la aplicación del agonista  $\text{GABA}_B$ , el baclofen (1  $\mu\text{M}$ ), produjo un incremento en la FPP, dependiente a la concentración utilizada, lo que sugiere que los receptores  $\text{GABA}_B$  actúan presinápticamente. Por otro lado el bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con  $\omega$ -Agatoxina TK ( $\omega$ -AgTx-TK), bloqueador de canales de calcio tipos P/Q, y la  $\omega$ -Conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTx-GVIA), bloqueador de canales de calcio tipo N produjeron también un incremento en la FPP. El incremento en la FPP fue mayor con  $\omega$ -CgTx-GVIA (1  $\mu\text{M}$ ) que con  $\omega$ -AgTx-TK (400 nM), sugiriendo la presencia de estos canales en las terminales corticostriatales de la tortuga. Por otro lado, la inhibición presináptica producida por la activación de receptores  $\text{GABA}_B$  fue ocluida por  $\omega$ -CgTx-GVIA, mientras que la  $\omega$ -AgTx-TK no tuvo efecto en esta oclusión, a diferencia de lo que se observa en mamíferos. Tomados en conjunto los datos sugieren que canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N y P/Q están presentes en las terminales nerviosas corticostriatales de la tortuga al igual que en los mamíferos. Sin embargo, al parecer existe un mayor número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N, participando activamente en la modulación presináptica GABAérgica. Mientras que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q al parecer no participan en esta modulación, al contrario de lo que ocurre en los mamíferos. Sin embargo, durante en etapas tempranas del desarrollo, los mamíferos modulan la acción del baclofen mediante estos canales, siendo un caso más en el que la ontogenia recapitula la filogenia.

Palabras clave: modulación presináptica, evolución, canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , GABA, tortuga, *Paleostriatum augmentatum*.

# INTRODUCCIÓN

El estriado es una de las estructuras mejor conservadas a lo largo de la escala filogenética, además de que es poco lo que se conoce acerca de la transmisión sináptica en grupos diferentes de cordados. Este trabajo se realizó con la finalidad de determinar la modulación de la liberación de neurotransmisores producida por la activación de receptores GABAérgicos en el *Paleostriatum augmentatum* de un reptil como la tortuga, además de contribuir al conocimiento de la acción tanto de los agonistas como de los antagonistas GABAérgicos en uno de los núcleos nerviosos más importantes en el SNC: El *Paleostriatum augmentatum*, que es equivalente al cuerpo estriado de los mamíferos (Reiner, et al., 1998); así como la forma por la cual los canales de  $Ca^{2+}$  modulan presinápticamente las entradas corticostriatales en esta sinapsis, para así poder establecer diferencias y similitudes entre estos resultados y los ya obtenidos previamente en nuestro laboratorio en el estriado de mamíferos (Barral, et al., 2000; 2001).

## ***La transmisión sináptica***

El mecanismo por el cual la información es transferida de una neurona a otra es la transmisión sináptica (Katz, 1966), la cual ocurre en sitios especializados denominados sinapsis, a través de las cuales se establecen microcircuitos neuronales y redes, las cuales son el sitio de comunicación entre las neuronas (Johnston y Wu, 1995). Existen dos tipos de sinapsis, eléctricas o químicas de acuerdo al mecanismo de transmisión. En la sinapsis eléctricas el cambio en el potencial de membrana es conducido por una vía de baja resistencia denominada unión estrecha o unión comunicante, formada por



conexinas, es rápida y frecuentemente bidireccional (Simon y Goudenough, 1998). En la sinapsis química se utiliza una substancia transmisora con la que la neurona presináptica se comunica con la postsináptica, esta substancia transmisora es sintetizada por la neurona presináptica, almacenada en vesículas sinápticas y liberada al espacio extracelular (Katz, 1966; Kandel, et al., 2000; Barral, et al., 2000). La probabilidad de liberación se incrementa poderosamente cuando la terminal nerviosa es depolarizada (Hammond, 2001; Kandel, et al., 2000), esto quiere decir que se trata de una exocitosis regulada por sensores del cambio en la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hammond, 2001; Kandel, et al., 2000), y cabe destacar que en condiciones de reposo la probabilidad de liberar una vesícula es muy baja, sin embargo no es nula (Hammond, et al., 2001; Kandel, et al., 2000).

La llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica provoca un incremento en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de una gran cantidad de canales concentrados en cada sitio de liberación (Fassio, et al., 1996; Burgoyne y Morgan, 1998; Barral, et al., 2001), y por consiguiente se promueve la liberación por exocitosis del neurotransmisor contenido en las vesículas. El neurotransmisor liberado, que puede ser GABA, glutamato, glicina, acetilcolina, dopamina y serotonina, reacciona con receptores específicos de la célula postsináptica, que a su vez generan corrientes sinápticas que provocan cambios en el potencial de membrana de ésta célula, debido a la apertura de canales dependientes de voltaje en ésta región, y sí el cambio en el potencial de dicha célula es suficiente para sobrepasar el potencial umbral de disparo de la célula antes

mencionada, entonces se inicia un potencial de acción postsináptico (Johnston y Wu, 1995; Kandel, et al., 2000).

### ***Canales de Ca<sup>2+</sup>***

Los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (CCDV) han sido clasificados de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en cinco tipos esenciales denominados T, L, N, P/Q y R. Los canales T son activados a potenciales cercanos al potencial de membrana (típicamente a potenciales más negativos de -50 mV); los canales restantes requieren mayores voltajes de activación (Catterall, 1998). Típicamente los canales N y P/Q se co-localizan junto a las series de vesículas ancladas en la sinapsis donde controlan la exocitosis, esto puede ser demostrado por la sensibilidad de varios tipos de neurotransmisores a bloqueadores específicos de esos canales (Miller, 1998; Wu y Saggau, 1997). Los canales R han sido los menos caracterizados debido a su insensibilidad a bloqueo farmacológico. Los canales más abundantes son los canales L, particularmente en las células musculares tanto esqueléticas como cardíacas donde juegan un papel esencial en el mecanismo de acople excitación-contracción, aunque también están presentes en las terminales nerviosas (Barral, et al., 2001; Catterall, 1998; Hammond, et al., 2001; Wu y Saggau, 1997).

### ***El papel del Ca<sup>2+</sup> en la liberación***

La liberación de neurotransmisor de vesículas sinápticas es inducida por el influjo de Ca<sup>2+</sup> en los CCDV (Fassio, et al., 1996), y la rapidez de esta

respuesta recae en la estrecha proximidad de los sitios en los cuales la exocitosis ocurre y los sitios de influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condiciones de reposo la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  no es mayor de  $10^{-7}$  o  $10^{-8}$  M, que es al menos 10,000 veces menor que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Penner, et al., 1993; Hammond, 1996). La despolarización producida por la llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica, provoca un cambio en la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya sea por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular debida a la activación de los CCDV (Wheeler, et al., 1994a y b; Barral, et al., 2000; 2001) o por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de sitios de almacenamiento intracelulares (Meldolesi, et al., 1988). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de CCDV es necesaria para producir la exocitosis de neurotransmisor (Flores-Hernández, et al., 1997; Zimmerman, 1993), el número de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que entran por unidad de tiempo depende de: a) el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  abiertos, los cuales dependen de la actividad presináptica, b) el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  susceptibles de activación y c) la activación de canales de  $\text{K}^+$  (Hammond, 2001). No todos los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están asociados a la liberación de neurotransmisor, por ejemplo en la sinapsis cortico-estriatal los canales L y T no participan directamente o su participación no es significativa (Bargas, et al., 1998; Barral, et al., 2001), sin embargo los canales L son susceptibles de ser modulados por diversos fármacos (Barral, et al., 2001). La modulación presináptica debido a la activación de los receptores  $\text{GABA}_B$  involucra proteínas G que señalizan e inhiben presinápticamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que provoca una reducción en la liberación de neurotransmisores (Misgeld, et al., 1995; Wu y Saggau, 1997; Barral, et al., 2000), además de que se ha propuesto que la activación de receptores  $\text{GABA}_B$  presinápticos inhibe la

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular modulando los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Chen y Van-den-Pol, 1998; Hirata, et al., 1995; Takahashi, et al., 1998).

### ***Evolución de los ganglios basales***

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

Dos poblaciones principales de neuronas de proyección han sido identificadas en las regiones dorsal y ventral del estriado de todos los amniotas,

estos dos tipos de neuronas de proyección son espinosas de tamaño medio, y liberan GABA<sub>B</sub>, pero difieren en el contenido de aminoácidos (Albin, et al., 1989; Graybiel, 1990; Reiner y Anderson, 1990; Reiner, et al., 1999), además de las neuronas espinosas de proyección (las cuales constituyen cerca del 90% de las neuronas del estriado en los mamíferos) el estriado dorsal y ventral de los amniotas contiene varios tipos de circuitos neuronales locales, un tipo está constituido por neuronas espinosas colinérgicas que están presentes en amniotas y al menos en algunos anfibios (Vincent y Reiner, 1987; Hoogland y Vermeulen-Van der Zee, 1990; Woolf, 1991; Medina, et al., 1993; Medina y Reiner, 1994; Marín, et al., 1997). Sin embargo, aunque la presencia de las neuronas colinérgicas en el estriado y el núcleo *accumbens* parece ser una característica común en los tetrápodos, hay diferencias importantes entre las especies en cuanto al número, localización y fisiología de éstas células (Hoogland y Vermeulen - Van der Zee, 1990; Henselmans, et al., 1991; Medina, et al., 1993; Marín, et al., 1997). No obstante la presencia de neuronas colinérgicas en al menos algunos anfibios implica que ya en tetrápodos primitivos las interacciones dopamina-acetilcolina podrían haber sucedido en el estriado desde etapas muy tempranas (Reiner, et al., 1998).

En los mamíferos se reconocen al menos tres poblaciones diferentes de neuronas GABAérgicas, que se distinguen basándose en el contenido químico (Wilson, 1998; Reiner, et al., 1998; Kita, 1993; Surmeier, et al., 1988): (1) células GABAérgicas conteniendo parvalbumina; (2) células GABAérgicas conteniendo somatostatina; (3) células GABAérgicas conteniendo óxido nítrico sintetasa y neuropéptido-Y (Kawaguchi, et al., 1995; Figueraeredo – Cárdenas,

et al., 1996), el estriado de anfibios, reptiles y aves también contiene células que son inmunorreactivas a algunas de esas sustancias (Marín, et al., 1998a y b; Reiner, et al., 1998), pero no se sabe si la función de las interneuronas estriatales GABAérgicas es similar a lo observado en los mamíferos, aunque la gran similitud de los circuitos sinápticos estriatales hace suponer que deben ser muy parecidos entre sí (Reiner, et al., 1998). A pesar de la falta de evidencia directa por estudios que apliquen la técnica de doble marcado, es posible decir que los circuitos locales de neuronas estaban ya presentes en el cerebro de tetrápodos antiguos y que el número de las poblaciones de células estriatales parece haber aumentado marcadamente a lo largo de la evolución (Smeets, et al., 2000).

### **Circuito de los ganglios basales**

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

El neostriado constituye la principal entrada a los ganglios basales, pues las fibras aferentes que ingresan al neostriado provenientes de la corteza sensorial, motora y de asociación liberan glutamato (McGeer, et al., 1977;

Molina, et al., 1999), y producen un patrón anatómico descrito por Ramón y Cajal como dendrítico cruciforme (Wilson, 1998), lo que significa que la fibra establece un curso relativamente recto a lo largo del tejido, cruzando sobre dendritas y dejando sinapsis *en passant*. Pero cabe destacar que esta no es la única vía para recibir información, también recibe información de los núcleos intralaminares del tálamo, recibe entradas dopaminérgicas de la (SNr) y entradas serotoninérgicas del núcleo del Rafé dorsal, así como entradas del núcleo basolateral de la amígdala para el núcleo *accumbens* (Lovinger y Tyler, 1996). Se sabe que la mayor parte de las neuronas del neostriado son neuronas de proyección, que reciben el nombre de espinosas medianas por el gran número de espinas dendríticas que presentan, y casi la mitad de estas neuronas proyectan únicamente al segmento externo del globo pálido formando la vía indirecta, co-liberando encefalinas (ENK); mientras que la otra mitad proyecta al globo pálido interno y a la SNr, co-liberando Sustancia-P (SP), formando así la vía directa (Misgeld, et al., 1979; Smith, et al., 1998; Wilson, 1998); asimismo los axones de estas neuronas sintetizan, almacenan y liberan ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA). Además existen otras estirpes neuronales cuyos axones se quedan en el neostriado, estableciendo los diversos tipos de interneuronas propias de este núcleo, cuyas características se han determinado por registros intracelulares, técnicas de identificación inmunocitoquímica, con base al contenido de neuromoduladores y neurotransmisores que poseen, describiéndose de esta manera: interneuronas colinérgicas grandes (2% de las células del neostriado), células en canasta, que contienen GABA y parvalbumina (células no-espinosas que rodean a los somas de las neuronas espinosas medianas son cerca del 3 al 5% del total de

la población neuronal) (Kita, 1993), células que contienen GABA, somatostatina y óxido nítrico sintetasa (representan menos del 2% de la población neuronal) (Di-Figuralia y Aronin, 1990; Takagi, et al., 1983; Wilson, 1998).

En los reptiles las proyecciones corticales al estriado no se han estudiado en tanto detalle como en mamíferos y aves, pero se sabe que las proyecciones corticostriatales surgen de las partes visual, somatosensorial y auditiva del palio telencefálico, y hay cierta evidencia de que esta proyección es glutamatérgica. Tampoco han sido identificadas proyecciones del pálido hacia el tálamo dorsal, aunque de la misma forma en que ocurre con los mamíferos, y aves, en los reptiles un grupo de núcleos talámicos dorsales proyecta al estriado, además de que parece haber núcleos intralaminares de la línea media de los mamíferos, los cuales tienen similitudes en cuanto a su histoquímica, topografía y eferencias, aunque una proyección del pálido hacia este no ha sido demostrada. Tanto en aves como en reptiles el estriado está localizado más ventral y las regiones del palio descansan inmediatamente dorsal a este, separadas por una lámina compuesta de células sin fibras, mientras que el tejido palial inmediato es la llamada cresta dorsal ventricular (DVR). Al igual que en las ratas, las interneuronas parvalbuminérgicas estriatales de las palomas y de las tortugas parecen ser especialmente ricas de entre todas las neuronas estriatales en cuanto a la cantidad de receptores AMPA, compuestos de subunidades GluR<sub>1</sub> y GluR<sub>4</sub>, mientras que las neuronas estriatales de proyección son ricas en subunidades GluR<sub>1</sub>, GluR<sub>2</sub> y GluR<sub>3</sub>. Al igual que en las aves, en los reptiles algunos núcleos talámicos dorsomediales proyectan al estriado y tienen proyecciones esparcidas hacia áreas corticales, tales como el



Wulst y partes de la DVR, en el caso de las aves, y la corteza dorsal, el engrosamiento palial y la DVR en el caso de los reptiles (Reiner et al, 1998). Se ha encontrado que la magnitud de la aferencia de ENK a las neuronas dopaminérgicas tegmentales varía entre mamíferos y reptiles, con una aferencia más prominente en serpientes, algunas lagartijas y en los primates. No obstante las neuronas de la SNr en aves y reptiles sí reciben aferencia estriatal de SP, y como en los mamíferos estas terminales de origen estriatal contactan neuronas de la SNr que son presumiblemente GABAérgicas.

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

## **La evolución de los circuitos sinápticos en los ganglios basales de cordados**

Los GB han recibido mucha atención durante las últimas 3 décadas debido a su relevancia clínica, y gracias a este interés se ha incrementado la comprensión de la estructura, organización y función de esta estructura cerebral. La mayor parte de la investigación se ha concentrado en los GB de los mamíferos, ya que estos son altamente complejos y muchos aspectos de su organización funcional es exclusiva a esta clase de vertebrados, aunque un número considerable de estudios se han llevado a cabo en vertebrados no mamíferos, en particular reptiles y aves. Un análisis comparativo de la organización de los GB de aves, reptiles, y muy recientemente en anfibios ha revelado que la evolución de los GB en los tetrápodos está mucho más conservada de lo que se pensaba anteriormente (Marín, et al., 1998a y b), pero no sólo en cuanto a la organización, sino también a que son muy similares en cuanto a las conexiones y las localizaciones celulares de muchos neurotransmisores, por ejemplo los anfibios actuales poseen un patrón de organización de los GB muy similar al de los reptiles, aves y mamíferos modernos, lo que hace pensar que las estructuras de los GB estaban probablemente presentes en el cerebro de tetrápodos ancestrales y que su organización comparte muchas características con los tetrápodos extintos, aunque esta estructura parece haber diferido en muchas formas en cuanto a su conectividad y la citoarquitectura en amniotas, implicando un cambio mayor en los GB y en su grado de organización en la transición evolutiva de anfibios a reptiles. Estudios recientes sobre las conexiones, la quimioarquitectura y el desarrollo del cerebro anterior basal de los anfibios ha revelado que los

vertebrados comparten un patrón común en la organización de los GB, uno de estos patrones son las similitudes en las conexiones en cuanto a la distribución de los marcadores químicos como dopamina, SP y ENK del estriado y del pálido, así como similitudes en el desarrollo y la expresión de los genes *homeobox* (Puelles y Rubenstein, 1993). La evolución de las aferentes talámicas al estriado se ha relacionado a la expansión de la corteza y, consecuentemente a la elaboración del sistema corticostriatal. La existencia de entradas sensoriales directas del tálamo al estriado parece ser una característica primitiva de los GB en los tetrápodos, y también parece que el estriado de los tetrápodos ancestrales fue el blanco de las proyecciones del complejo talámico nuclear dorsal, el cual recibe entradas de naturaleza diversa, además de que es importante señalar que el estriado es la estructura más receptiva de los GB en todos los tetrápodos y recibe sus principales entradas de la corteza (o palio), el tálamo, así como de las neuronas dopaminérgicas del complejo del área ventral tegmental–sustancia nigra. El circuito funcional de los GB también es muy parecido en todos los amniotas, aunque los GB parecen haber pasado por una elaboración mayor durante la transición evolutiva de anfibios a reptiles. Esta elaboración pudo haber permitido a los amniotas aprender y/o ejecutar un repertorio más sofisticado de conductas y movimientos, lo que pudo haber sido un elemento importante en la exitosa adaptación de los amniotas a un hábitat completamente terrestre. Aunque el linaje de los mamíferos, parece haber divergido de algún modo del linaje de los saurópsidos (reptiles y aves) con respecto al surgimiento de la corteza cerebral como blanco principal del circuito de los GB dedicado a la ejecución del control del movimiento.

## ***La modulación GABAérgica***

El GABA es quizás el más importante neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema periférico (Princivalle, et al., 2001; Sivilotti y Nistri 1991), y es posible que mucha de la entrada inhibitoria al SNC mediada por GABA es posible de que se origine en la SNR. Hasta la fecha se han descrito tres tipos de receptores GABAérgicos: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, y GABA<sub>C</sub>. En el neostriado el GABA es liberado por las neuronas de proyección y por varios tipos de interneuronas (Wilson, 1998). En el neostriado, el GABA actúa sobre receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. La activación de receptores GABA<sub>B</sub> en la sinapsis cortico-estriatal produce inhibición presináptica en la liberación de glutamato (Kamatchi y Ticku, 1990; Nisenbaum y Berger, 1992a y b; 1993; Barral, et al., 2000), en las interneuronas colinérgicas estriatales (De-Boer y Westernik, 1994) y en terminales dopaminérgicas que llegan al neostriado (Smolders, et al., 1995), lo que provoca que también se afecte la liberación de GABA por activación de autorreceptores (Seabrook, et al., 1991; Bowery, 1993; Misgeld, et al., 1995), pero esto no es exclusivo de estas sinapsis, ya que los receptores GABA<sub>B</sub> existen en las terminales sinápticas de sinápsis inhibitorias y su activación suprime la liberación de GABA en el hipocampo (Harrison, 1990; Thompson y Gähwlier, 1992); cabe advertir que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos puede deprimir aferencias tanto excitatorias como inhibitorias (Davies, 1981; Dutar y Nicoll, 1988b; Harrison, et al., 1988), en respuestas postsinápticas estos receptores pueden propiciar una corriente depolarizante de Ca<sup>2+</sup>, mientras que durante procesos actividad-dependientes, el GABA liberado de una terminal axónica activa los receptores GABA<sub>B</sub> de los astrocitos, los cuales controlan la liberación de glutamato; otra función de estos

receptores es que los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos inhiben la liberación del neurotransmisor, mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> decrecen la excitabilidad de las motoneuronas. Exceptuando a los receptores GABA<sub>C</sub> (que están localizados principalmente en la retina), los receptores GABAérgicos se encuentran distribuidos prácticamente en todas las regiones del SNC (Hammond, 2001; Dutar y Nicoll, 1993) tanto a nivel pre- como postsináptico (Princivalle, et al., 2001; Sivilotti y Nistri, 1991; Towers, et al., 2000), aunque los sitios de unión de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> tienen diferente distribución en el cerebro (Misgeld, 1995), tal vez las más notables diferencias están en el cerebelo: los receptores GABA<sub>B</sub> están principalmente en la capa molecular mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> predominan en la capa de células granulosas; en las terminales sinápticas predominan receptores GABA<sub>B</sub> (Nisenbaum y Berger, 1992a y b; 1993; Chan, et al., 1998), principalmente las que provienen de la corteza, ya que el número de receptores GABA<sub>B</sub> se reduce después de decorticación crónica (Moratalla y Bowery, 1991) sin que se vea afectada la distribución postsináptica de receptores GABA<sub>A</sub>, debido a esta localización tan particular las neuronas GABAérgicas participan en una variedad de procesos fisiológicos incluyendo cadenas de sincronización y la generación de ritmos theta y gamma, los que se piensa están asociados con funciones cognitivas (Cherubini y Conti, 2001), es importante mencionar que la activación de este neurotransmisor se ha implicado en algunos desórdenes neuropsiquiátricos (Cherubini y Conti, 2001). Por otro lado, estudios inmunocitoquímicos han mostrado la existencia de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en terminales sinápticas, y que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> puede regular la eficiencia sináptica a nivel pre- y postsináptico (Delgado-Lezama, et al., 2004), además

de que la sinapsis en el hipocampo está modulada por la activación de receptores postsinápticos sensibles a muscimol y receptores presinápticos sensibles a baclofen (Dutar y Nicoll, 1988a y b); otro tipo de estudios como lo pueden ser los neurológicos o los electrofisiológicos en diversas regiones cerebrales indican que el efecto mediado por el receptor GABA<sub>B</sub> es dependiente de la frecuencia y la intensidad de la estimulación, lo que sugiere que los moduladores presinápticos se activan dependiendo de la actividad sináptica (Dutar y Nicoll, 1988a y b; Kombian, et al., 1996), cabe mencionar que muchos fármacos actúan en los receptores GABA<sub>A</sub>, en particular ligados al sitio de benzodiazepina (BZ), utilizados clínicamente en el tratamiento de la ansiedad, insomnio, espasmos musculares y epilepsia (Bowery y Brown, 1997), usando una autoradiografía *in vitro* en cerebros de humanos post-mortem Chu y colaboradores (1987) demostraron que el número de sitios de unión GABA<sub>B</sub> en la corteza frontal de pacientes con la enfermedad de Alzheimer decrecía hasta 68%, mientras que el número de los sitios de GABA<sub>A</sub> tuvieron muy pocos cambios, sugiriendo que este receptor puede también tener un papel importante en algunas patologías.

Los potenciales inhibitorios postsinápticos (IPSP's) son bifásicos y sus componentes se pueden separar farmacológicamente (Sugita, et al., 1992), el componente rápido (10ms) se debe a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>, los cuales tienen incorporado un canal iónico de cloro (Sugita, et al., 1992) y están involucrados en los sistemas neuronales (Sugita, et al., 1992), mientras que el componente lento (100 ms) se debe a la apertura de un canal de potasio, ya que los receptores GABA<sub>B</sub> están acoplados a estos canales a través

de proteínas G (Sugita, et al., 1992) y pertenecen a sistemas regulatorios del cerebro.

### **Receptores GABA<sub>A</sub>**

La estimulación de los receptores GABA<sub>A</sub> con agonistas específicos (muscimol) o alostéricos (Pentobarbital, Pregnanolone) produce un incremento de la conductancia del Cl<sup>-</sup> en la membrana (Barrer, et al., 1986; Callachan, et al., 1987), ya que estos receptores son canales de cloro hetero-oligoméricos que son alostéricamente regulados por BZ, barbitúricos y anestésicos esteroides, y pueden ser saturados por la concentración de GABA liberado que no active los receptores GABA<sub>B</sub> postsinápticos, aunque una gran cantidad de GABA debe de ser liberado para activar estos receptores, debido a esto se dice que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> produce una inhibición postsináptica (Nicoll, et al., 1990), algo importante de señalar es que se han observado dos respuestas de GABA<sub>A</sub> cinéticamente evocadas (GABA<sub>A, fast</sub> y GABA<sub>A, slow</sub>) que son sinápticas en su origen, además de que las terminales sinápticas que generan éstas dos respuestas provienen de distintas poblaciones de interneuronas que difieren en sus rangos espontáneos de disparo, e incorporan estructuralmente diferentes receptores postsinápticos (Banks, et al., 1998), y son distintas en su sensibilidad a la furosemida (Pearce, 1993), la respuesta GABA<sub>A, slow</sub> quizás no sea tan importante fisiológicamente. Por otro lado las células en canasta son las candidatas más viables a ser las GABA<sub>A, fast</sub>, porque al menos en el hipocampo, proyectan al estriado piramidal y al *striatum radiatum* proximal exclusivamente (Banks, et al., 1998), mientras que las interneuronas en el *striatum lacunosum molecular* son las candidatas a ser las

GABA<sub>A, slow</sub> porque protegen las regiones dendríticas exclusivamente y no exhiben actividad espontánea (Williams, et al., 1992).

### **Receptores GABA<sub>B</sub>**

Los receptores GABA<sub>B</sub> pertenecen a una clase de receptores que se acoplan a los canales iónicos por un sitio regulatorio de ensamble (proteínas G), asociado a un modesto incremento en la conductancia al potasio. La activación de estos receptores podría cambiar la función de los receptores GABA<sub>A</sub>, y también decrementar el voltaje en las corrientes de Ca<sup>2+</sup> (depresión de la liberación de GABA disminuyendo la entrada de Ca<sup>2+</sup>). Las proteínas G acopladas a los receptores GABA<sub>B</sub> deprimen la liberación de GABA e inhiben corrientes de Ca<sup>2+</sup>, aunque no ha sido demostrado que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> deprima la liberación de GABA inhibiendo corrientes de Ca<sup>2+</sup>, este decaimiento no se debe a un cambio en el potencial de equilibrio del cloro, sino que más bien se debe a una reducción en su conductancia, aunado a una hiperpolarización presináptica. La activación del autoreceptor GABA<sub>B</sub> putativo con el resultante decaimiento de la inhibición, incrementa la excitabilidad de las corrientes NMDA y LTP, mientras que la activación del receptor GABA<sub>B</sub> postsináptico puede reducir las corrientes NMDA. La inhibición de GABA<sub>B</sub> postsináptica promueve el disparo repetitivo e hiperpolariza las neuronas mientras se reduce su resistencia al estímulo, por otra parte la desinhibición mediada por GABA<sub>B</sub> es la primera forma de desinhibición ya que este receptor también puede participar en una depresión tónica de la liberación de GABA, otro punto importante sobre estos receptores es que los receptores GABA<sub>B</sub> tienen un papel exclusivamente inhibitorio en la señalización química



de las sinapsis centrales (Morishita, et al., 1998). Otra de las funciones de este receptor es que su activación disminuye la liberación de aminas, aminoácidos excitatorios, neuropéptidos y hormonas; promueve una fuerte inhibición presináptica de la liberación de GABA, principalmente modulando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q en las terminales axónicas, pero en general modulan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto inhiben la neurotransmisión; interactúan con el receptor mGluR y modulan las respuestas fisiológicas mediados por este receptor en estas sinapsis, esto es debido a que la localización de estos dos receptores es similar fisiológicamente (Morishita, et al., 1998); inhiben la liberación cuántica de GABA en la región CA1 del cerebro de los roedores, que está regulada por PKC; disminuyen la liberación eléctricamente estimulada de GABA cuando los receptores  $\text{GABA}_B$  inhiben su propia liberación; estos dos efectos en la membrana han sido atribuidos a la activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ , el incremento de la actividad de la GTPasa que convierte GTP en GDP y re formar el heterotrímero de la proteína G, esta activación no modula las respuestas postsinápticas de los receptores  $\text{GABA}_A$ . Es importante advertir que Varios neurotransmisores con requerimiento de proteína G, incluyendo al GABA, modulan la liberación cuántica del transmisor.

Los agonistas  $\text{GABA}_B$  pueden activar conductancias de potasio mediante la aplicación de ácido araquidónico (mensajero intracelular liberado mediante la activación de la enzima fosfolipasa-A dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , además de que no juega un papel importante en la acción presináptica del baclofen), al usar el agonista selectivo baclofen (Hill y Bowery, 1981) para activar estos receptores se induce un incremento en la conductancia de la membrana al  $\text{K}^+$  (Gähwiler y

Brown, 1985; Newberry y Nicoll, 1984) la cual puede ser bloqueada por el antagonista phaclofen (Kerr, et al., 1987), o un decremento presináptico en la conductancia del  $\text{Ca}^{2+}$  (Dolphin y Scout, 1986) que es resistente al Phaclofen pero antagonizada por el saclofen (Harrison, et al., 1990; Kerr, et al., 1988). Los autoreceptores  $\text{GABA}_B$  deprimen la liberación de GABA en las sinápsis axodendríticas y aproximadamente en la mitad de las axo-somáticas, en donde los heteroreceptores a receptores a opioides tipo- $\mu$  actúan en ambas sinapsis. Una parte substancial del mecanismo de la acción del receptor  $\text{GABA}_B$  en muchas regiones del cerebro está mediado por la activación de canales de  $\text{K}^+$  a través de proteínas G sensibles a la toxina *pertusis* (PTX), la activación postsináptica vía  $\text{GABA}_B$  de corrientes de  $\text{K}^+$ , a menudo conllevan a una hiperpolarización, los receptores  $\text{GABA}_B$  están acoplados a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de una proteína G sensible a PTX. Muchos subtipos de receptores  $\text{GABA}_B$  pueden existir, farmacológicamente hay diferentes tipos, como por ejemplo uno que es sensible a PTX, y otro que no lo es; los receptores  $\text{GABA}_B$  producen una inhibición presináptica en la liberación del transmisor (Bowery, et al., 1980; Davies, 1981; Gray y Green, 1987) y en la modulación de corrientes postinápticas de potasio (Gähwiler y Brown, 1985; Dutar y Nicoll, 1988a y b; Soltesz, et al., 1988), y esto ocasiona que se acorte la duración del potencial de acción (Saint, et al., 1990; Gage, 1992), la activación de estos receptores también provoca un bloqueo reversible de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , en contraste a lo que sucede en las corrientes de potasio con fijación de voltaje en las que el baclofen parece no tener efecto, pero por el contrario bloquea una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N (Tsien, et al., 1988; Aosaki y Kasai, 1989; Williams, et al., 1992). No hay que perder de vista que la activación de canales de  $\text{K}^+$  y/o la inhibición de

los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en terminales presinápticas ha sido propuesta como una causa para la inhibición presináptica (Thompson, et al., 1993), la depresión en la liberación de GABA por los autoreceptores  $\text{GABA}_B$  parece estar mediada principalmente a través de la modulación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos.

El presente trabajo fue hecho con la finalidad de contribuir al conocimiento de la acción tanto de los agonistas como de los antagonistas GABAérgicos, así como la forma por la cual los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  modulan presinápticamente las entradas corticostriatales en esta sinapsis.

Este tipo de estudios ayudan a resolver la incógnita de cómo ha evolucionado la organización sináptica de los mamíferos, y para resolverla se parte de grupos filogenéticamente inferiores, para comprender ésta organización, para así poder compararla con la de los mamíferos. Por lo que este trabajo se realizó con la finalidad de determinar la modulación de la liberación de neurotransmisores producida por la activación de receptores GABAérgicos en el *Paleostriatum augmentatum*, además de contribuir al conocimiento de la acción tanto de los agonistas como de los antagonistas GABAérgicos en uno de los núcleos nerviosos más importantes en el SNC de la tortuga: el *Paleostriatum augmentatum*, que es equivalente al cuerpo estriado de los mamíferos; así como la forma por la cual los canales de  $Ca^{2+}$  modulan presinápticamente las entradas corticostriatales en esta sinapsis, para así poder establecer diferencias y similitudes entre estos resultados y los ya obtenidos previamente en el laboratorio en nuestro laboratorio en el estriado de mamíferos (Barral, et al., 2000).

## JUSTIFICACIÓN

El estudio de la modulación presináptica en todos los vertebrados juega un papel importante, en la comunicación entre neuronas (sinapsis) y la liberación de neurotransmisores que participan en esta modulación. Para conocer de qué manera surge la comunicación entre neuronas, es necesario tener una idea de los mecanismos que participan tanto en la liberación e inhibición de neurotransmisores. El glutamato es un importante neurotransmisor que participa en la modulación presináptica. Este puede ser inhibido por la liberación de GABA un neurotransmisor inhibitorio de otros receptores ionotrópicos. Aunque este mecanismo ya es conocido en los mamíferos, aun no se ha demostrado esta participación en grupos inferiores como los reptiles, que son el grupo de organismos que dio origen a los mamíferos, asimismo por ser los primeros organismos en invadir completamente el medio terrestre. El presente estudio se realizó en tortugas ya que son un grupo representativo dentro de los reptiles con una importancia evolutiva muy clara (por ser uno de los grupos más antiguos de esta Clase). No se han realizado estudios que demuestren la modulación en estos organismos, la cual se cree que puede ser glutamatérgica, para demostrar esta hipótesis, se pretende estudiar de que forma ocurre ésta en tortugas, esto por la relación filogenética que tienen con anamniotas actuales (peces y anfibios), además de la transición evolutiva entre los diferentes grupos de organismos.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Algunos transmisores encargados de la modulación presináptica corticostriatal actúan regulando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Los transmisores que no actúan sobre conductancias de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{K}^+$ , podrían estar actuando sobre la maquinaria de liberación.
- Algunos de los transmisores que actúan presinápticamente convergen sobre ciertos sistemas de señalización intraterminal.

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la modulación de la liberación de neurotransmisores producida por la activación de receptores GABAérgicos en el *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga.
- Comparar la acción de los receptores GABAérgicos en la sinapsis corticostriatal de mamíferos y reptiles.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Aportar evidencias de que la sinapsis que se establece entre la corteza cerebral y el *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga corresponde funcionalmente a una sinapsis glutamatérgica, tal como se observa en mamíferos.
- Establecer la presencia de receptores  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_B$  en la sinapsis corticostriatal de la tortuga
- Determinar si la acción de los receptores GABAérgicos  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_B$  ocurre presináptica o postsinápticamente en la sinapsis corticostriatal de la tortuga.
- Si la acción de alguno de los receptores GABAérgicos es presináptica, determinar cuál o cuáles canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están involucrados en esta modulación.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## ***Diseción de Tortuga***

Se utilizaron tortugas *Trachemys scripta elegans*, adultas, de más de 15 cm de longitud del plastron (Hutchinson, 1992) que fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (100 mg/kg), para después decapitarlas y extraer el cerebro. Se realizaron cortes coronales para obtener rebanadas de 400  $\mu\text{m}$  de espesor a baja temperatura. Las rebanadas fueron obtenidas con ayuda de un vibratomo, para ser sumergidas en solución salina fría, en mM: 96.5 NaCl, 2.6 KCl, 31.5 NaHCO<sub>3</sub>, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 4.0 CaCl<sub>2</sub>, y 20 de Glucosa (Delgado-Lezama, et al., 2004), la solución fue saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para obtener un pH de 7.4. Una vez obtenidas las rebanadas se mantuvieron en incubación con solución salina a temperatura ambiente en un periodo de tiempo no menor a 60 min. Las rebanadas fueron trasladadas a una cámara de registro, donde se les hizo pasar un flujo constante de  $2 \pm 0.5$  ml/min de solución salina. Los fármacos que se utilizaron en este experimento fueron disueltos previamente en solución salina y se administraron a través del dispositivo de perfusión.

## ***Sistema de Estimulación y Registro***

Los registros fueron obtenidos estimulando las fibras aferentes al *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga, de acuerdo al atlas estereotáxico propuesto por Powers y Reiner (1980). Se utilizaron electrodos bipolares concéntricos de 100  $\mu\text{m}$  en la punta. Los estímulos se mandaron digitalmente con auxilio de la computadora, pasándolos a través de una unidad aisladora



(Digitimer DS2) en donde se reguló la intensidad (0-25 Volts), la duración (0.01-0.04 ms) y la frecuencia (0.4-0.06 Hz). Para el registro de los potenciales de campo se emplearon técnicas convencionales de amplificación y registro: fueron utilizados electrodos de vidrio estirados por calentamiento, fabricados a partir de capilares de borosilicato de 1.0 mm de diámetro externo con una resistencia en la punta de 2-4 M $\Omega$  con NaCl al 0.9% como conductor. La señal electrofisiológica obtenida fue transferida a una computadora PC mediante el uso de programas diseñados en ambiente LabView. Cada trazo registrado fue medido, promediado, analizado y graficado mediante el programa Origin (v 7.5 Microcal Software, Northampton, MA. U.S.A).

### ***El Registro Extracelular de Potenciales de Campo***

Los potenciales de campo fueron registros extracelulares de las corrientes iónicas asociadas a la actividad de una población de neuronas. Las corrientes producen espigas poblacionales debido a la sincronización 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 (Barral, 2001; Johnston y Wu, 1995). El potencial de campo registrado extracelularmente es una onda trifásica producida por la diferencia de potencial, debida al cambio en la localización de los sumideros y las fuentes de corriente activa. Cabe señalar que la zona en que las corrientes fluyen hacia el interior de la célula se le denomina sumidero, es decir corrientes entrantes activas, y a la zona en que ésta sale se le llama fuente, corrientes salientes que cierran el circuito (Johnston y Wu, 1995). En el registro extracelular las corrientes salientes se observan como deflexiones

positivas, mientras que las corrientes entrantes se observan como deflexiones negativas. Cuando se registran 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 depolarización 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 depolarización de la membrana del soma por el flujo de corriente entrante. La fase positiva corresponde a la reversión en el flujo de corriente (Barral, 2001; Johnston y Wu, 1995).

### ***Facilitación por Pulso Pareado***

Para el estudio de los eventos presinápticos se utilizó el protocolo de facilitación por pulso pareado (FPP), el cual se basa en la hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$  residual propuesta por Katz y Miledi a finales de los años 60's (Katz y Miledi, 1968; Katz y Miledi, 1970). La hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$  residual se basa en el hecho de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para la liberación de neurotransmisor. Pequeñas modificaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular bastan para alterar sensiblemente la aparición espontánea de potenciales miniatura, y por lo tanto liberación de neurotransmisor (Del-Castillo y Katz, 1954a y b). 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  $\text{Ca}^{2+}$  seguida de un pulso nervioso (Barral, et al., 2000; 2001).

### ***Fármacos utilizados***

Para la realización del presente trabajo se utilizaron los siguientes fármacos:  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTx), bloqueador de canales de tipo  $\text{Ca}^{2+}$  N;  $\omega$ -agatoxina TK ( $\omega$ -AgaTK), bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q, adquiridos a Alomone Labs (Jerusalem, Israel). D 2-amino-5-phosphonopentanoate (APV), bloqueador de receptores glutamatérgicos NMDA; 6-ciano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), bloqueador de receptores glutamatérgicos AMPA; (+/-)-baclofen (baclofen), agonista  $\text{GABA}_B$ ; (-)-bicuculline (bicuculina), antagonista  $\text{GABA}_A$ ; [3H] muscimol (muscimol), agonista  $\text{GABA}_A$ ; 2-OH saclofen (saclofen), antagonista  $\text{GABA}_B$ . Todos ellos adquiridos a Sigma-RBI, St. Louis, MO.

### ***Análisis de datos***

Se tomaron muestras de datos antes y después de la aplicación de los bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como de los agonistas y antagonistas tanto de  $\text{GABA}_A$  como de  $\text{GABA}_B$ . Los cambios en la FPP se expresan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (ESM). Para el análisis se utilizó la prueba de  $t$  de Student para datos pareados, previa prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov). Además, se realizó la prueba no-paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

## RESULTADOS

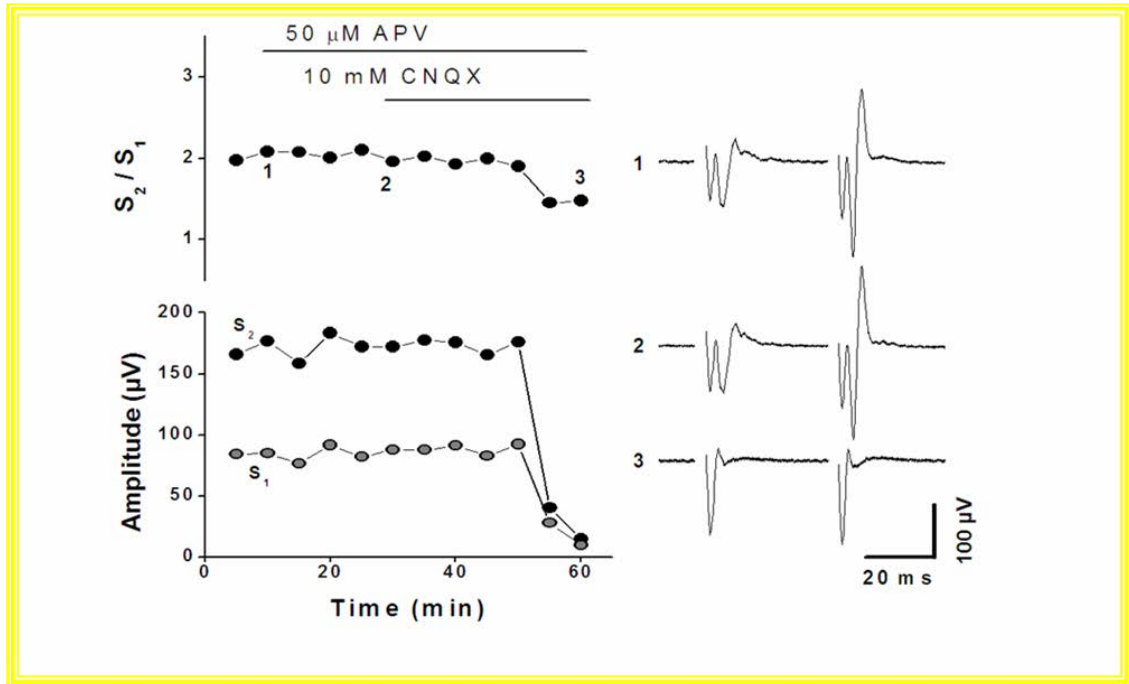
### ***La sinapsis corticostriatal en la tortuga es glutamatérgica***

Una de las primeras preguntas que nos planteamos fue determinar si el neurotransmisor que se libera de las aferentes corticales que establecen sinapsis en el *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga era glutamato, como había sido sugerido previamente (Fowler, et al., 1999). Para ello se bloquearon los receptores glutamatérgicos NMDA con APV, y AMPA con CNQX. Como se puede observar en la Figura 1, el componente sináptico del registro de campo desaparece ( $N_2$ ); mientras que la respuesta antidrómica persiste ( $N_1$ ). Después de tomar una línea base de 10 minutos que sirvió de control se agregó APV (50  $\mu$ M). Se puede observar en la Figura 1 que la aplicación del bloqueador NMDA no modifica la amplitud de la respuesta. Sin embargo, cuando se agrega CNQX (10  $\mu$ M) la amplitud de los potenciales sinápticos disminuye notablemente sin que se vea afectado el componente antidrómico. Por otro lado se puede observar que tampoco se afecta la la relación de pulso pareado ( $S_2/S_1$ ). Nuestros datos sugieren que el glutamato es el principal neurotransmisor en la sinapsis cortico-estriatal de la tortuga.

### ***La activación de receptores GABAérgicos***

En la sinapsis corticostriatal de la rata se ha descrito que los receptores GABA<sub>A</sub> se encuentran localizados postsinápticamente (Nisenbaum, et al., 1992a y b; 1993; Dutar y Nicoll, 1993) mientras que los receptores GABA<sub>B</sub> se localizan tanto pre- como postsinápticamente (Barral, et al., 2000; Nisembaum, et al., 1992a y b; 1993; Dutar y Nicoll 1993) por lo que en esta parte realizamos

experimentos para averiguar si los receptores GABAérgicos ( $GABA_A$  y  $GABA_B$ ) se encontraban en la porción pre- o postsináptica de la sinapsis corticostriatal de la tortuga.



**Figura 1. La sinapsis corticostriatal es glutamatérgica.** En esta Figura se muestra la acción de los antagonistas glutamatérgicos APV (bloqueador de receptores NMDA), y CNQX (bloqueador de receptores AMPA). Al poner APV no se observa una respuesta, mientras que al agregar CNQX sí se observa un cambio tanto en la facilitación como en las amplitudes.

### **Modulación por Receptores $GABA_A$**

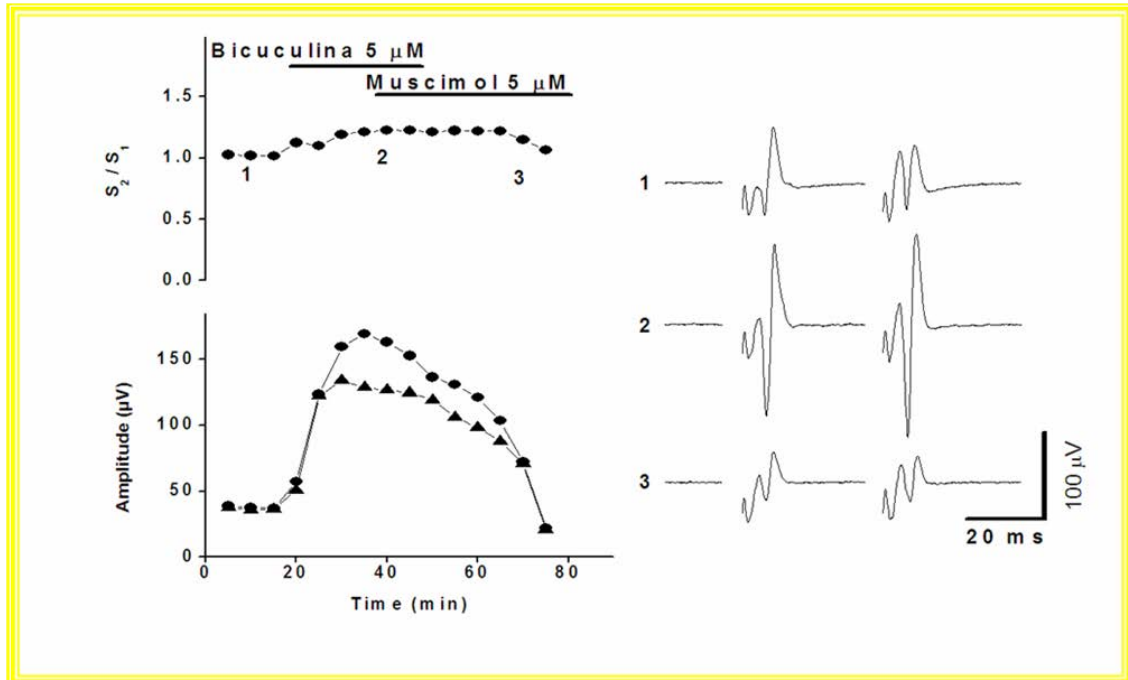
Para establecer si los receptores GABA se localizan pre- o postsinápticamente realizamos experimentos en donde se agregó un antagonista específico de receptores  $GABA_A$ , bicuculina. En presencia de bicuculina pudimos observar que en algunos casos la FPP no se vio alterada ya que varió de  $1.358 \pm 0.190$  en el control a  $1.348 \pm 0.199$  ( $n = 6$ ; NS) en presencia de bicuculina. Sin embargo como la bicuculina bloquea vías inhibitorias, es común que la amplitud de los potenciales sinápticos se modifica

de manera importante (Figura 2), En muchos experimentos observamos que la amplitud se incrementó de  $37.6 \pm 5 \mu\text{V}$  a  $134.1 \pm 7 \mu\text{V}$  ( $n = 36$ ;  $p < 0.05$ ) en presencia de bicuculina. Esto se debe a que los receptores  $\text{GABA}_A$ , sensibles a bicuculina, tanto en mamíferos como en tortugas maduras, median un flujo de cloro con una fuerte rectificación saliente (Blanton y Kriegstein, 1992). Por otro lado cuando se agrega un agonista específico de receptores  $\text{GABA}_A$ , el muscimol, en presencia de bicuculina, se aprecia que la amplitud de la respuesta no se ve afectada (Figura 2). Sin embargo, cuando se retira la bicuculina del baño de perfusión y permanece únicamente el muscimol, se produjo una significativa disminución en la amplitud de la respuesta sináptica de  $136.5 \pm 10 \mu\text{V}$  a  $23.67 \pm 11 \mu\text{V}$ . No obstante lo anterior, la FPP no se vio alterada ya que pasó de  $1.375 \pm 0.186$  en presencia de bicuculina a  $1.874 \pm 0.581$  ( $n = 6$ ; NS) en ausencia de ésta (Figura 2). Nuestros datos sugieren que la acción de los receptores  $\text{GABA}_A$  es postsináptica, ya que los cambios observados en la FPP no fueron significativos, a pesar de observarse importantes cambios en la amplitud de las respuestas tanto en presencia del antagonista como del agonista específicos.

### **Modulación por Receptores $\text{GABA}_B$**

Los receptores  $\text{GABA}_B$  se han reportado en terminales nerviosas así como en somas de diferentes regiones del SNC (Dutar y Nicoll, 1993; Misgeld, 1995). También han sido descritos en la sinapsis corticostriatal (Nisenbaum, 1992a y b; Barral, et al., 2000), por lo que realizamos experimentos para determinar el efecto que ejerce la activación de receptores  $\text{GABA}_B$  en reptiles,

como la tortuga, utilizando agonistas y antagonistas específicos, como el baclofen y el 2-OH saclofen



**Figura 2. Acción de los receptores GABA<sub>A</sub>.** En la Figura se muestra la acción del agonista específico muscimol, en presencia del antagonista específico bicuculina, el cual sólo produjo un cambio en las amplitudes, pero no en la facilitación, lo que sugiere que esta acción es postsináptica.

### ***El bloqueo con antagonistas específicos (2-OH saclofen) no modifica la respuesta presináptica***

En la Figura 3 se puede observar que la aplicación del antagonista específico 2OH-saclofen ( $500 \mu\text{M}$ ) no produjo cambios en las amplitudes de las respuestas sinápticas ni en la FPP, alterada ya que pasó de  $1.266 \pm 0.323$  en presencia del antagonista GABA<sub>B</sub> a  $1.415 \pm 0.484$  ( $n = 4$ ; NS). En estas condiciones se agregó al baño de perfusión el agonista específico, baclofen ( $1 \mu\text{M}$ ), en presencia del 2-OH saclofen. Como se esperaba al estar ocupados los receptores GABA<sub>B</sub> por su antagonista no se produjo ningún cambio en la

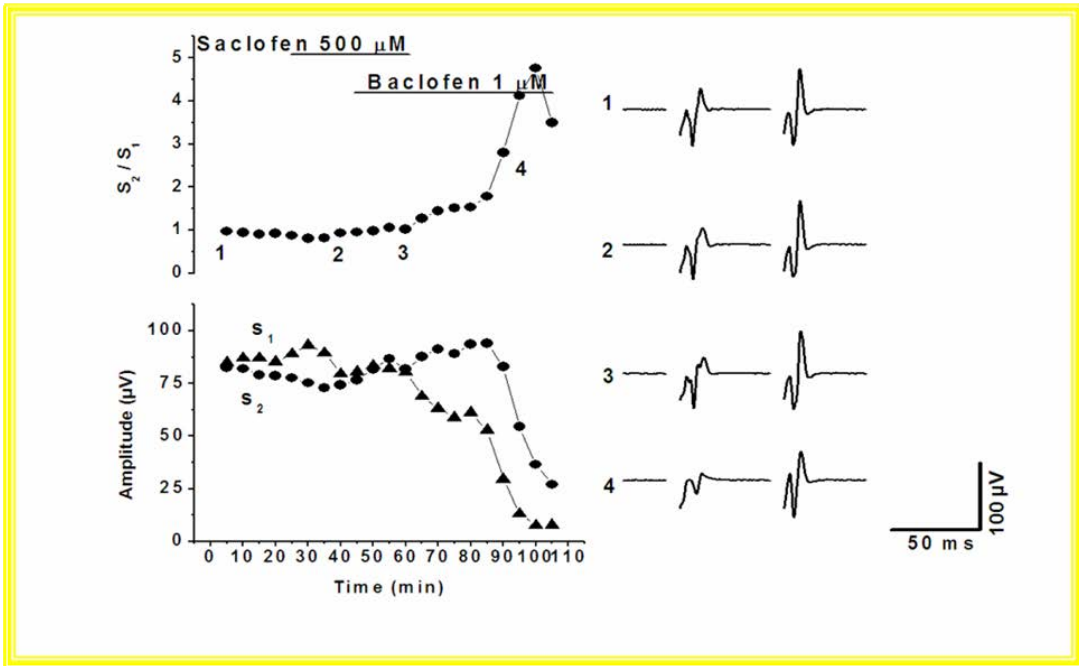
respuesta sináptica, ni en la amplitud, que pasó de  $85.4 \pm 5$  a  $89.6 \pm 9 \mu\text{V}$  ( $n = 5$ , NS), ni en la facilitación que pasó de  $1.415 \pm 0.484$  a  $1.518 \pm 0.502\%$  ( $n = 4$ ; NS).

Posteriormente se quitó el 2-OH saclofen del baño de perfusión, quedando únicamente el baclofen, después de 15 minutos se quitó el 2-OH saclofen, y se dejó sólo al baclofen. En estas condiciones se observaron los mayores cambios en la facilitación ya que pasó de  $1.518 \pm 0.502$  a  $4.656 \pm 0.110$  ( $n = 4$ ;  $p < 0.05$ ), así como en las amplitudes (pasó de  $80.13 \pm 6$  a  $7.65 \pm 9 \mu\text{V}$   $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ), las cuales disminuyeron significativamente, lo que sugiere que la acción de los receptores  $\text{GABA}_B$  es presináptica.

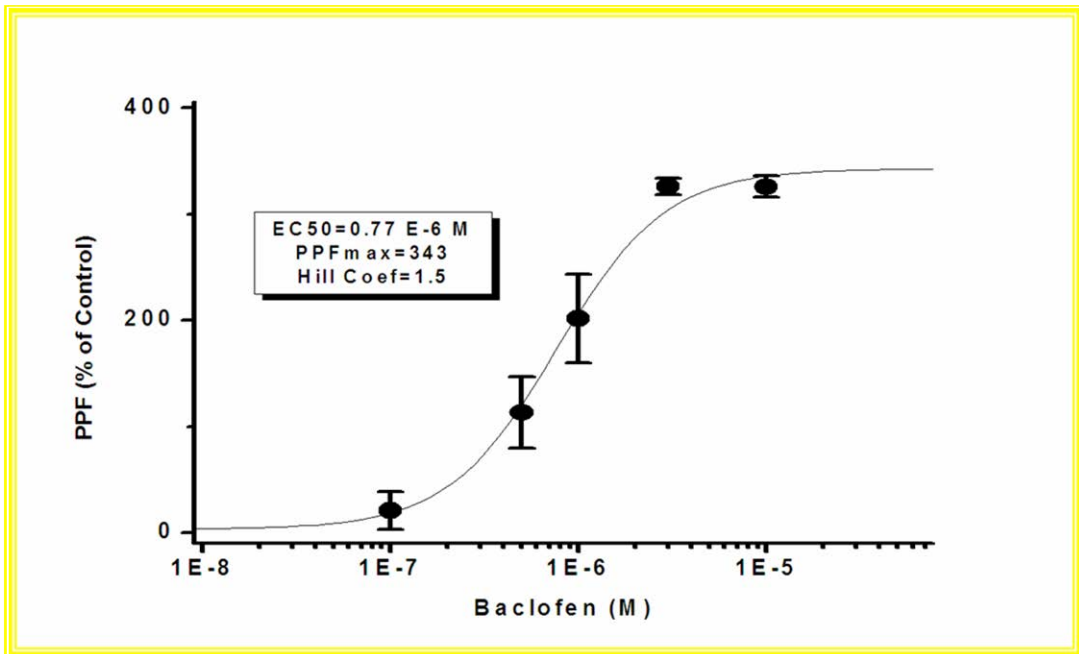
Como esperabamos la activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ , produjo un incremento en la modulación presináptica, ya que el %FPP se incrementó en un  $114.39 \pm 50.9 \%$  ( $n = 6$ ;  $P < 0.01$ ), en presencia de baclofen, así como una disminución en la amplitud del sináptico, lo que sugiere que estos receptores se localizan presinápticamente. La activación de receptores  $\text{GABA}_B$  es dependiente de la concentración.

Con la finalidad de comparar el efecto del baclofen en el estriado de rata (Barral, et al., 2000) con lo observado en el estriado de tortuga, realizamos una curva dosis respuesta (Figura 4), aumentando la concentración del baclofen, (0.1 - 10  $\mu\text{M}$ ). Se observa que conforme se incrementa la concentración hay un incremento en el %FPP hasta lograr una concentración saturante (2 $\mu\text{M}$ ), después de la cual no aumenta la respuesta. Cada punto en la gráfica representa una serie de 5 experimentos.





**Figura 3. Modulación presináptica producida por la activación de los receptores  $GABA_B$ .** en esta Figura se muestra la acción del antagonista específico 2-OH saclofen, y la acción del agonista específico baclofen. El saclofen no provoca cambios ni en las amplitudes ni en la facilitación, mientras que el baclofen sí provoca cambios tanto en la facilitación (aumento) como en las amplitudes (disminución).



**Figura 4. La FPP producida por el baclofen es dependiente de la concentración.** A medida de que se va aumentando la concentración, aumenta la respuesta, hasta cierto punto ( $2\mu$ M) en el cual por más que se aumente la concentración, no aumenta la respuesta.

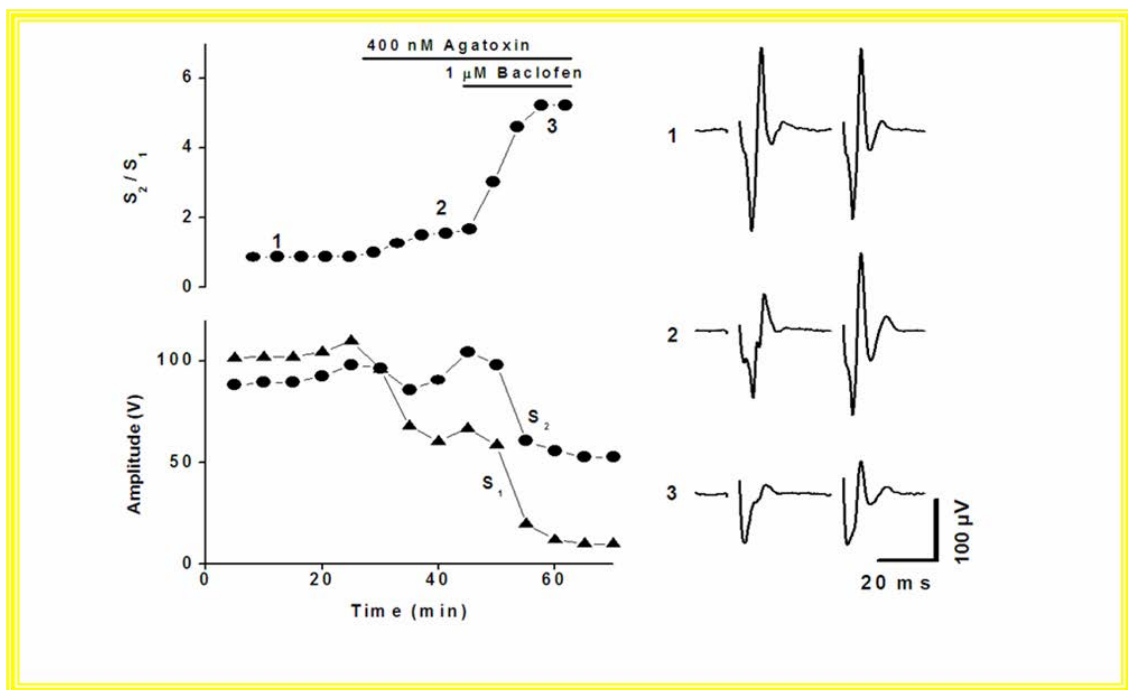
### ***Modulación por Canales de Ca<sup>2+</sup>***

Se ha demostrado que la modulación presináptica producida por receptores GABA<sub>B</sub> en los mamíferos (Nisenbaum, et al., 1992b), actúa bloqueando canales de Ca<sup>2+</sup> en el hipocampo (Harrison, 1990; Thompson y Gähwlier, 1992), y en la corteza (Wang, et al., 2005), así como en la sinapsis corticostriatal (Barral, et al., 2000). También se ha demostrado en las terminales corticostriatales de la rata la presencia de los canales Ca<sup>2+</sup> tipos L, N y P/Q; los canales N y P/Q están involucrados en el proceso de liberación pero solo los canales P/Q son susceptibles de ser modulados, los canales tipo L no participan en el proceso de liberación pero son susceptibles de ser modulados (Barral, et al., 2000; 2001; Bargas, et al., 1998). Con el fin de establecer qué canales de Ca<sup>2+</sup> están participando de esta modulación se hicieron experimentos de oclusión farmacológica con las toxinas que bloquean canales de Ca<sup>2+</sup>.

### ***El bloqueo de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q no ocluye el efecto del baclofen***

Uno de los aspectos más importantes de este trabajo fue la de evidenciar la presencia y participación de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q en terminales nerviosas de la tortuga, ya que hasta donde sabemos no habían sido reportadas con anterioridad en el SNC de reptiles. En nuestro caso la aplicación de  $\omega$ -AgTx TK (400 nM) produjo un incremento en la FPP de  $1.266 \pm 0.613$  a  $2.277 \pm 0.387$  (n = 4; P < 0.05), lo que sugiere la presencia de estos canales en las terminales corticostriatales de la tortuga. En estas condiciones, se agregó baclofen (1  $\mu$ M) y se observó que el bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q no ocluyó el efecto del baclofen, ya que como se muestra en la Figura

5 la aplicación del bloqueador específico ( $\omega$ -AgTx TK) no impide que la aplicación del agonista GABA<sub>B</sub> produzca un incremento en la FPP, ya que el baclofen produjo un incremento en la FPP de  $1.929 \pm 0.230$  a  $4.410 \pm 0.400$  ( $n = 4$ ;  $P = 0.011$ ). Entonces el cambio en la FPP producido por el baclofen en presencia de  $\omega$ -AgTx TK fue de  $137.74 \pm 34.40 \%$  lo que sugiere que los canales de calcio tipos P/Q no participan de esta modulación.



**Figura 5.** El bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo-P/Q no ocluye el efecto del baclofen. Al agregar la  $\omega$ -Agatoxina TK se observa un cambio en la facilitación, y un pequeño cambio en las amplitudes, pero al agregar baclofen se observa un incremento mayor de la facilitación, así como una disminución más marcada de las amplitudes, lo que sugiere que el papel de los canales P/Q en la modulación corticostriatal de la tortuga no es muy importante.

**La FPP producida por el baclofen es ocluida casi completamente después de bloquear Canales de  $Ca^{2+}$  tipo N.**

Para bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N se utilizó  $\omega$ -CgTx GVIA, el bloqueo de este canal produjo inhibición presináptica. Ya que se observó un

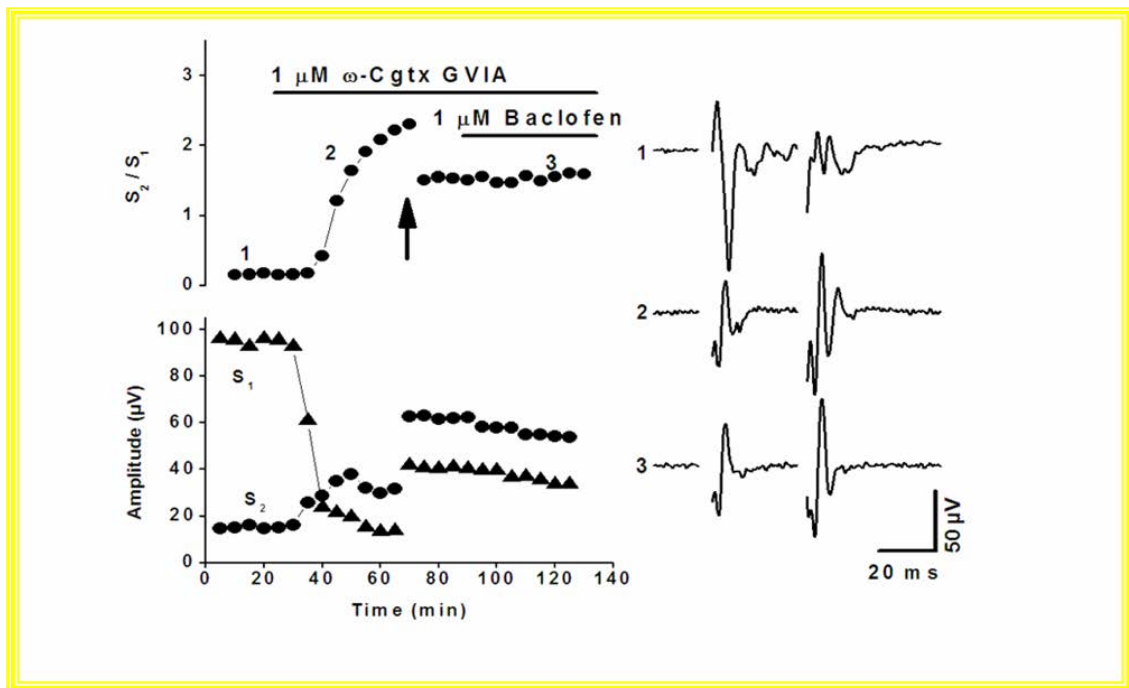
incremento en la PPF desde  $1.102 \pm 0.130$  en el control a  $1.613 \pm 0.132$  en presencia del péptido ( $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ), indicando su participación en la liberación de glutamato en estas sinapsis.

Sin embargo, cuando los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N se bloquean con  $1 \mu M$  de  $\omega$ -CgTx GVIA, la acción del baclofen se ve casi completamente ocluída. Como se muestra en la Figura 6, después de bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, se incrementó el voltaje con la finalidad de reclutar la mayor cantidad de neuronas y mejorar la respuesta sináptica. La aplicación de baclofen en presencia de  $\omega$ -CgTx GVIA ocluyó la acción presináptica del agonista  $GABA_B$  ya que impidió que se produjera un incremento en la FPP ( $0.606 \pm 1.33 \%$ ), la cual cambió de  $2.375 \pm 0.341$  a  $2.294 \pm 0.527$  ( $n = 6$ , NS) en presencia de baclofen. Lo que sugiere que la activación de receptores  $GABA_B$  en la sinapsis corticostriatal de la tortuga está actuando sobre canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, a diferencia de lo que ocurre con los canales tipo P/Q.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se muestran registros extracelulares en el *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga. Se comprueba que al igual que en mamíferos, el neurotransmisor liberado en la sinapsis corticostriatal es glutamato (Lovinger y Tyler, 1996; McGeer y McGeer, 1993), como ya había sido sugerido previamente (Fowler, et al., 1999) la modulación producida por la activación de receptores GABAérgicos tipo  $GABA_A$  es postsináptico (Nisembaum, et al., 1992a y b), asimismo la modulación producida por la activación de receptores GABAérgicos tipo  $GABA_B$  en la tortuga fue presináptico al igual que en

mamíferos (Nisembaum, 1992a y b; Barral, et al., 2000). Uno de los aspectos más importantes en este trabajo fue evidenciar la presencia y participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipos N y P/Q en la sinapsis corticoestriatal de la tortuga; sin embargo, resultó de particular relevancia el demostrar que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrados en la liberación de neurotransmisores fueron los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N, y no los canales P/Q como se ha observado en la misma sinapsis de mamífero (Barral, et al., 2000; 2001).



**Figura 6.** El bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-N ocluyó el efecto del baclofen. Al agregar la  $\omega$ -Conotoxina GVIA se observa un aumento en la facilitación y una disminución en las amplitudes, y al agregar el baclofen no se observa ninguno de estos cambios, lo que sugiere un papel importante de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  N en la modulación de la tortuga.

En los reptiles (Delgado-Lezama, et al., 2004), en diversas regiones del SNC, como es el caso de la medula espinal de la tortuga, la transmisión sináptica excitatoria depende de la liberación del glutamato. El glutamato es

considerado como el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso, y está presente en la gran mayoría de las sinapsis, sino es que en todos los compartimientos celulares (Kenigfest, et al., 1998), y está involucrado en un sinnúmero de rutas metabólicas en el SNC (Kenigfest, et al., 1998), asimismo activa muchos tipos de receptores (Blanton y Kriegstein, 1992), generalmente clasificados como receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y receptores no NMDA (AMPA) que son sensibles a APV y a CNQX, respectivamente.

### ***GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>***

La acción de los receptores GABA<sub>A</sub> es postsináptica debido a las respuestas observadas al aplicar el antagonista específico bicuculina. En presencia de bicuculina la FPP no se ve alterada, a pesar de que las amplitudes se ven profundamente afectadas. Al agregar el agonista específico muscimol en presencia de bicuculina no observamos cambios significativos, lo que nos confirma la especificidad de los agonistas y antagonistas GABAérgicos en reptiles. Sin embargo, al quitar la bicuculina y quedar sólo el muscimol las amplitudes disminuyeron, aunque la FPP no se vió afectada ni en presencia ni en ausencia de este agonista. Por lo que podemos concluir que la acción de los receptores GABA<sub>A</sub> es postsináptica, ya que no hubo cambios en la FPP, sólo en las amplitudes. Estos cambios en las amplitudes se pueden explicar por cambios en la conductancia de la membrana postsináptica debidos a la activación de receptores GABA<sub>A</sub>. Mientras que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> produjo un aumento en la FPP, y una disminución en las amplitudes al agregar baclofen, por lo que se concluye que el efecto de los receptores GABA<sub>B</sub> es presináptico.

## ***Muscimol***

Al comparar la acción de antagonistas GABA<sub>A</sub> con la acción del muscimol, este requiere de más tiempo que los antagonistas para producir algún efecto, pero este efecto es mayor que el producido por los antagonistas (Ariel, 1989).

Como se esperaba no hubo diferencias significativas en la FPP después de la aplicación de bicuculina ya que el efecto de ésta es presináptico, y por lo tanto no influye en la FPP. Mientras que tampoco hubo diferencias significativas en la FPP al aplicar muscimol en presencia de bicuculina, ni al dejar al muscimol solo. Sin embargo se aprecian diferencias significativas en las amplitudes, lo que demuestra que tanto el efecto como la ubicación de los receptores GABA<sub>A</sub> es postsináptico, y al sólo haber cambios en las amplitudes se infiere que hubo cambios en la cantidad de neurotransmisor que se liberó por parte de las dos células (tanto a nivel pre como postsináptico), además de que estas dos células liberaron ambas la misma cantidad, por el contrario si hay cambios en la FPP quiere decir que las células liberan cantidades diferentes de neurotransmisor; si la célula presináptica libera más que la célula postsináptica se da una depresión por pulso pareado (DPP), mientras que si ocurre lo contrario se da una FPP.

## ***Bicuculina***

La bicuculina, un antagonista potente de GABA<sub>A</sub>, deprime tanto las respuestas a GABA como los IPSP'S de latencia corta, pero no así los IPSP'S de latencia larga (Kriegstein y Connors, 1986), esto se asocia con una tendencia a volver el potencial de membrana en reposo relativamente depolarizado (Nowycky, et al., 1981). La bicuculina aparentemente incrementa la duración de los EPSPs, lo cual puede deberse a la remoción de una hiperpolarización retardada debido al acortamiento del control de la respuesta excitatoria GABA<sub>A</sub> (Ariel y Kogo, 2001; Kogo, et al., 2002). Otro punto importante para mencionar es que el baclofen no altera el efecto de la bicuculina (Ariel, 1989).

## ***La acción del bloqueador específico bicuculina***

En terminos generales, al agregar bicuculina se observó que las amplitudes aumentaban considerablemente, pero no así la FPP, lo que indica que este bloqueador actúa postsinápticamente, inhibiendo los receptores GABA<sub>A</sub>, ya que es un antagonista potente y además específico de estos receptores, pero cabe mencionar que esto lo hace sin afectar los receptores GABA<sub>B</sub>, los cuales son presinápticos, debido a que al momento de aplicar baclofen, un agonista selectivo de estos receptores se produce un cambio en la FPP, y no un cambio en las amplitudes. Si los receptores GABA<sub>B</sub> se vieran inhibidos se observaría una depresión por pulso pareado, en lugar de ver una FPP.



## **Baclofen**

El baclofen actúa deprimiendo la excitación glutamatérgica de neuronas neocorticales debido a la estimulación de receptores GABA<sub>B</sub>, los cuales están localizados en las terminales de las aferentes glutamatérgicas, pero también actúa deprimiendo corrientes inhibitorias espontáneas presinápticamente, (Blanton y Kriegstein, 1992), esta inhibición del baclofen está relacionada al flujo de Ca<sup>2+</sup>, posiblemente a través de la modulación de CCDV, mientras que los efectos depresivos del baclofen en los EPSPs dependientes de glutamato son mediados exclusivamente a través de receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos en las terminales de aferencia glutamatérgica. Otro efecto del baclofen es la inhibición de la liberación cuántica de GABA, incluso en el hipocampo. La fosforilación por PKC no sólo propicia la liberación del transmisor, sino que también reduce la inhibición de la liberación cuántica, provocada por baclofen, mientras que la activación de PKA por forskolina no solo reduce el efecto del baclofen, sino que también propicia la liberación del transmisor (Jarolimek y Misgeld, 1997), además de que reduce la probabilidad de una liberación espontánea en las interneuronas inhibitorias. La acción específica del baclofen está más enfocada a la liberación presináptica de GABA, que a la modulación postsináptica de los receptores GABA, esto tiene sentido cuando se comprueba que el baclofen no modula los receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos (Gong y Van den Pol 1998), además de que el baclofen decremента la liberación de GABA evocada por potasio en los sinaptosomas (Dunwiddie y Lovinger, 1993), y no cambia la función postsináptica de los receptores GABA<sub>A</sub>.

## ***La activación es dependiente de la concentración***

Strauss en 1986 en un estudio *in vitro* en el cerebelo de la rana, bloqueó con baclofen el componente postsináptico del potencial de campo, requiriendo de 0.10 – 1.0 mM para lograr la completa inhibición de la respuesta. Esto es muy similar a lo ocurrido en nuestros experimentos, ya que para lograr la completa inhibición del potencial de campo en la sinapsis corticostriatal de la tortuga, se realizó una curva dosis respuesta, aumentando la concentración del baclofen, (0.1 - 10  $\mu$ M). Mientras se incrementó la concentración hay un incremento en el %FPP hasta que se alcanzo una concentración saturante (2  $\mu$ M), después de la cual ya no se incremento la respuesta. La curva Dosis-Respuesta observada en los cortes del cerebro de tortuga no es muy diferente a la observada en los cortes del cerebro de rata, ya que el  $EC_{50}$  en la tortuga fue de 0.77  $\mu$ M, mientras que en la rata fue de 0.57  $\mu$ M (Barral, et al., 2000). Las similitudes no fueron tan estrechas al comparar la FPP máxima, cuyos valores fueron de 343% para el estriado de tortuga y de 457% para el estriado de rata; lo mismo ocurre al comparar el coeficiente de Hill, el cual tuvo valores de 1.5 para el estriado de tortuga y de 2.2 en el caso del estriado de rata (Barral, et al., 2000).

## ***2-OH saclofen***

El saclofen, reduce la influencia del  $Ca^{2+}$ , debido a la liberación de GABA en el lóbulo olfatorio de la tortuga (Wachowiak y Cohen, 1999), mientras que en el *Paleostriatum augmentatum* la aplicación del antagonista específico (2OH saclofen) no produce cambios significativos en la FPP ni la amplitud de los

potenciales de campo (Figura 3). Por otro lado, la aplicación del agonista específico (baclofen) en presencia de 2-OH saclofen tampoco produjo cambios significativos. Sin embargo, después de lavar al antagonista, el baclofen produjo un importante incremento en la FPP, lo que produjo diferencias significativas. Por lo que la ubicación de los receptores GABA<sub>B</sub> y la acción del baclofen es presináptica. Se concluye esto con base a que solo al lavar al antagonista y dejar solo al agonista se observaron cambios en la FPP, y así se comprueba que la acción de estos receptores es presináptica, ya que si no fuera así se producirían cambios en las amplitudes, además debido a que no afecta la sensibilidad postsináptica hacia GABA (Thompson, et al., 1993).

### ***Los Canales de Ca<sup>2+</sup>***

Los principales canales iónicos involucrados en la modulación presináptica son los canales de Ca<sup>2+</sup>, en ese sentido se ha demostrado que la activación de receptores GABA<sub>B</sub> produce inhibición presináptica en diferentes estructuras nerviosas (Kahle y Cotman, 1993; Thompson, et al., 1993), entre las que se incluye la sinapsis corticostriatal (Nisembaum, et al., 1992a y b, Barral, et al., 2000), las neuronas del SNC (Gong y Van den Pol, 1993), el hipocampo (Dunwiddie y Lovinger, 1993), así como en el cerebro anterior de los vertebrados (Karen, et al., 1994). Además de que participa en la inhibición presináptica del transmisor (Bowery, et al., 1980; Davies, 1981; Gray y Green, 1987) y en la modulación de corrientes postinápticas de potasio (Gähwlier y Brown, 1985; Dutar y Nicholl, 1988a y b; Soltesz, et al., 1988), lo que ocasiona que se acorte la duración del potencial de acción (Saint, et al., 1990; Gage, 1992).

### ***ω-Agatoxina TK***

El bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q con  $\omega$ -AgTX TK, produjo un incremento en la FPP, aunque este incremento fue menor al observado con  $\omega$ -CgTx-GVIA (1  $\mu\text{M}$ ). El cambio en la FPP después de la aplicación de  $\omega$ -AgTx-TK produce una inhibición presináptica consistente con la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q en estas terminales, con lo que se confirma la presencia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q en las terminales corticostriatales de la tortuga, lo que es uno de los aspectos más importantes de este trabajo, ya que hasta donde sabemos no habían sido reportadas con anterioridad en el SNC de reptiles.

No obstante lo anterior, ésta toxina no tuvo efecto en la inhibición presináptica producida por la activación de receptores  $\text{GABA}_B$ , ya que el baclofen siguió facilitando a pesar de tener los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q bloqueados con  $\omega$ -AgTx-TK a concentraciones saturantes, a diferencia de lo que se ha observado en mamíferos (Barral, et al., 2000), por lo que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q no participan activamente en la modulación presináptica  $\text{GABA}_B$ érgica, aunque sí lo hacen en la liberación, al contrario de lo que ocurre en los mamíferos.

### ***ω-Conotoxina GVIA***

La modulación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  es mediado por receptores  $\text{GABA}_B$  en presencia de  $\omega$ -CgTX, una reducción en una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\omega$ -CgTX podría contribuir a la inhibición presináptica del receptor

GABA<sub>B</sub>. La inhibición de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> es voltaje dependiente, y para explicar esta dependencia Bean (1989) propuso un modelo en el que los transmisores como el GABA inhiben las corrientes de Ca<sup>2+</sup> cambiando los canales de Ca<sup>2+</sup> del modo abierto o dispuesto al cerrado o no dispuesto, en cuanto a su apertura.

Los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N están presentes a nivel presináptico en las terminales nerviosas corticostriatales de la tortuga al igual que en los mamíferos. Sin embargo, al parecer existe un mayor número de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N, participando activamente en la modulación presináptica GABAérgica, y en la liberación de glutamato en estas sinapsis. Para el bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N se utilizó  $\omega$ -CgTx GVIA, lo que produjo una inhibición presináptica, así como un incremento en la FPP, confirmando la presencia de estos canales en las terminales corticostriatales de la tortuga. El incremento en la FPP fue mayor con  $\omega$ -CgTx-GVIA (1  $\mu$ M) que con  $\omega$ -AgTx-TK (400 nM), mientras que el cambio de voltaje no produce cambios significativos en la FPP. Por otro lado, la inhibición presináptica producida por la activación de receptores GABA<sub>B</sub> fue ocluida por  $\omega$ -CgTx-GVIA, además de que bloqueó la acción presináptica del baclofen e impidió que se produjera un incremento en la FPP, ya que este agonista prácticamente no tuvo participación, por lo que la activación de estos receptores en la sinapsis corticostriatal de la tortuga actúa sobre canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N.

En general no hay grandes diferencias entre la sinapsis corticostriatal de los reptiles (tortuga), y la de los mamíferos (rata), ya que tanto los agonistas

como los antagonistas GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> tienen los mismos efectos en la tortuga así como en las ratas. Tampoco hay diferencias en cuanto a los tipos de canales de Ca<sup>2+</sup> que están presentes, pero sí en el número y en la modulación, esto es de gran importancia, ya que la modulación en estas dos clases de cordados es completamente diferente, ya que la de las ratas adultas se da por los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q (Barral, et al., 2000), mientras que en los reptiles se da por canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N. Esta modulación por canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N no es ajena a las ratas, ya que en las ratas jóvenes se da esta modulación (Salgado, et al., 2005), pero a medida de que tanto el desarrollo neuronal, así como el crecimiento en general de la rata continúan, el número de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N modulando va decreciendo (Salgado, et al., 2005), mientras que el número de canales P/Q va aumentando (Salgado, et al., 2005), hasta que se llega a un punto en donde los canales P/Q son los que dominan, y son los encargados de la modulación (Salgado, et al., 2005).

Llama poderosamente la atención que el canal susceptible de ser modulado en la sinapsis corticostriatal de la tortuga sea el canal de Ca<sup>2+</sup> tipo N, ya que experimentos realizados en mamíferos han demostrado que son los canales tipo P/Q son los que modulan la acción del baclofen. Aunque en etapas tempranas en el desarrollo de las ratas, los canales que modulan esta acción son los mismos canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N, pero conforme el animal va envejeciendo, los canales que modulan van cambiando, y cada vez los canales P/Q van teniendo más importancia, hasta que por fin son los dominantes en la modulación, siendo un caso más en donde se comprueba que la ontogenia recapitula la filogenia.

## CONCLUSIONES

- Este es el primer trabajo donde se muestran registros extracelulares de la sinapsis corticostriatal en el *Paleostriatum augmentatum* de la tortuga, que es el equivalente al estriado de los mamíferos.
- La aplicación de muscimol en la sinapsis corticostriatal de la rata sugiere un efecto postsináptico, es decir que los receptores GABA<sub>A</sub> deben encontrarse en la postsinapsis ya que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> no produjo cambios en la FPP, el único cambio observado ocurrió en las amplitudes, que aumentaron significativamente.
- El efecto de la activación de receptores GABA<sub>B</sub> fue presináptico, ya que el baclofen produjo no sólo cambios en las amplitudes sino que también en la FPP.
- Los canales de Ca<sup>2+</sup> involucrados en la modulación GABAérgica de la sinapsis corticostriatal de la tortuga son los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N, ya que la aplicación de baclofen en presencia de ω-Conotoxina GVIA, no produjo más cambios en la FPP producida por el baclofen, a diferencia de lo ocurrido con la ω-Agatoxina TK, ya que la aplicación de baclofen en presencia de esta toxina continuó produciendo FPP.

## REFERENCIAS

- 1.- Albin RL, Young AB, Penney JB .1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*. 12:366-375.
- 2.- Aosaki T, y Kasai H. 1989. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch*. 414(2):150-6.
- 3.- Ariel M y Kogo N. 2001. Direction tuning of inhibitory inputs to the turtle accessory optic system. *J Neurophysiol* 86: 2919–2930.
- 4.- Ariel M. 1989. Analysis of vertebrate eye movements following intravitreal drug injections. iii. spontaneous nystagmus is modulated by the GABA<sub>A</sub> receptor. *Journal of neurophysiology* 62(2): 469-80.
- 5.- Banks MI, Li TB, Pearce RA. 1998. The synaptic basis of GABA<sub>A</sub>, slow. *J Neurosci*. 1998 18(4):1305-17.
- 6.- Bargas J, Ayala GX, Hernandez E, Galarraga E. 1998. Ca<sup>2+</sup>-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull*. 45(5):521-4.
- 7.- Barker JL, Harrison NL, y Mariani AP. 1986. Benzodiazepine pharmacology of cultured mammalian CNS neurons. *Life Sci*. 39(21):1959-68.
- 8.- Barral J, 2001. Modulación presináptica de las aferentes excitatorias glutamatérgicas al neostriado de la rata. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México DF.
- 9.- Barral J, Poblete F, Mendoza E, Pineda J, Galárraga E, Margas J. 2001. High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by ω-agatoxin TK. *European Journal of Pharmacology* 430:167–173.
- 10.- Barral J, Toro S, Galarraga E, Bargas J. 2000. GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca(2+) channels. *Neurosci Lett* 283(1): 33-6.
- 11.- Bean BP. 1989. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153-156.
- 12.- Blanton M y Kriegstein A. 1992. Properties of Amino Acid Neurotransmitter Receptors of Embryonic Cortical Neurons When Activated by Exogenous and Endogenous Agonists. *Journal of Neurophysiology* 67(5): 1185-200.
- 13.- Bowery N.G. 1993. GABA<sub>B</sub> receptors pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 33:109-147.
- 14.- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, y Turnbull M. 1980. (-)baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*. 283(5742):92-4.
- 15.- Bowery NG, y Brown DA. 1997. The cloning of GABA(B) receptors. *Nature*. 386(6622):223-4.
- 16.- Burgoyne R.D., A. Morgan. 1998. Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 24:367-376.
- 17.- Callachan H, Cottrell GA, Hather NY, Lambert JJ, Nooney JM, y Peters JA. 1987. Modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor by progesterone metabolites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 231(1264):359-69.
- 18.- Catterall, WA. 1998. Structure and function of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their role in neurotransmitter release. *Cell. Calcium* 24:307-323.
- 19.- Chan KY, Leung KS, Yung W. 1998. Differential expression of pre- and postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors in rat substantia nigra pars reticulata neurones. *Eur J. Pharmacol*. 349:187-197.



- 20.- Chen G, y Van der Pol AN. 1998. Presynaptic GABA<sub>B</sub> autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channel and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci*. 18(59):1913-1922.
- 21.- Cherubini E, y Conti F. 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci*. 24(3):155-62.
- 22.- Chesselet MF, Delfs JM. 1996. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neuroscienc*. 19:417-422.
- 23.- Chu DC, Penney JB Jr, Young AB. 1987. Cortical GABA<sub>B</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors in Alzheimer's disease: a quantitative autoradiographic study.
- 24.- Davies J. 1981. Selective depression of synaptic excitation in cat spinal neurones by baclofen: an iontophoretic study. *Br J Pharmacol*. 72(2):373-84.
- 25.- De-Boer P, Westernik BH. 1994. GABAergic modulation of striatal cholinergic interneurons: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*. 62(1):70-75 .
- 26.- Del-Castillo J. y Katz B. 1954a. Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol*. 124:560-573.
- 27.- Del-Castillo J. y Katz B. 1954b. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J. Physiol*. 124:574-585.
- 28.- Delgado-Lezama R, Aguilar J, y Cueva-Rolón R. 2004. Synaptic Strength Between Motoneurons and Terminals of the Dorsolateral Funiculus Is Regulated by GABA Receptors in the Tirtle Spinal Cord. *J Neurophysiol* 91: 40-47.
- 29.- DiFiguralia M, Aronin N. 1990. Synaptic interactions between GABAergic neurons and trigeminothalamic cells in the rat trigeminal nucleus caudalis. *Synapse* 6(4):358-63.
- 30.- Dolphin AC, Scott RH. 1986. Inhibition of calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by (-)-baclofen. *Br J Pharmacol*. 1986 May;88(1):213-20.
- 31.- Dunwiddie T y Lovinger D. 1993. Presynaptic receptors in the mammalian brain. Birkhäuser, Boston.
- 32.- Dutar P, Nicoll R. 1993. GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the hippocampus: pharmacology and intracellular mechanisms. En T.V. Dunwiddie y D.M. Lovinger (Eds.), *Presynaptic Receptors In The Mammalian Brain*, Birkhäuser, Boston, pp. 14-26.
- 33.- Dutar P, Nicoll RA. 1988 a. A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors in the central nervous system. *Nature*. 332:156-158.
- 34.- Dutar P, Nicoll RA. 1988b. Pre-and postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptor in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1:585-591.
- 35.- Fassio A, Bonanno G, Fontana G, Usai C, Marchi M, Raiteri M. 1996. Role of external and internal calcium on heterocarrier-mediated transmitter release. *J Neurochem*. 66(4):1468-74.
- 36.- Figueredo-Cárdenas G, Morello M, Sancesario G, Bernardi G, Reiner A .1996. Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rats. *Brain Research* 735:317-324.
- 37.- Flores-Hernández J, Galarraga E, Bargas J. 1997. Dopamine selects glutamatergic excitatory inputs to the neostriatum. *Synapse*. 25:185-195.
- 38.- Fowler M, Medina L, Reiner A .1999. Inmunohistochemical localization of NMDA- and AMPA-type glutamate receptor subunits in the basal ganglia of red eared turtles. *Brain, Behavior and Evolution* 54:276-289.
- 39.- Gage PW. 1992. Activation and modulation of neuronal K<sup>+</sup> channels by GABA. *Trends Neurosci*. 15(2):46-51.

- 40.- Gähwiler BH, y Brown DA. 1985. GABA<sub>B</sub>-receptor-activated K<sup>+</sup> current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. Proc Natl Acad Sci 82(5):1558-62.
- 41.- Gong C y Van den Pol A. 1998. Presynaptic GABA<sub>B</sub> Autoreceptor Modulation of P/Q-Type Calcium Channels and GABA release in Rta Suprachiasmatic Nucleus Neurons. The journal of neuroscience, 18(5): 1913-1922.
- 42.- Gray JA, Green AR. 1987. Increased GABA<sub>B</sub> receptor function in mouse frontal cortex after repeated administration of antidepressant drugs or electroconvulsive shocks. Br J Pharmacol. 92(2):357-62.
- 43.- Graybiel AM. 1990. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. Trends in Neurosciences. 13:244±254.
- 44.- Hammond C. 1996. Cellular and molecular neurobiology. Academic Press. N.Y. pp 188-214.
- 45.- Hammond M. 2001. Neuropeptide Y receptor antagonists. IDrugs. 4(8):920-7.
- 46.- Hammond V, Howell B, Godinho L, Tan SS. 2001. Disabled-1 functions cell autonomously during radial migration and cortical layering of pyramidal neurons. J Neurosci. 21(22):8798-808.
- 47.- Harrison MB, Wiley RG, y Wooten GF. 1990. Selective localization of striatal D1 receptors to striatonigral neurons. Brain Res. 528(2):317-22.
- 48.- Harrison NL .1990. On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurons. J Physiol. 422:433-446.
- 49.- Harrison NL, Lange GD, Barker JL. 1988. (-)-baclofen activates presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors on GABAergic inhibitory neurons from embryonic rat hippocampus. Neurosci Lett. 85(1):105-9.
- 50.- Henselmans JML, Hoogland PV, Stoof JC .1991. Differences in the regulation of acetylcholine release upon D-2 dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor activation between the striatal complex of reptiles and the neostriatum of rats. Brain Research 566:8-12.
- 51.- Hill DR, y Bowery NG. 1981. 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in rat brain. Nature. 290(5802):149-52.
- 52.- Hirata K, Ohno-Shosaku T, Sawada S, Yamamoto C. 1995. baclofen inhibits GABAergic transmission alter treatment with type-specific calcium channel blockers in cultured rat hippocampal neurons. Neurosci. Lett. 187: 205-208.
- 53.- Hoogland PV, y Vermeulen-Vanderzee E. 1990. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the telencephalon of the lizard *Gekko gecko*. Brain, Behavior and Evolution. 36:378-390.
- 54.- Hutchinson A. 1992. A Reproducing Population of *Trachemys scripta elegans* In Southern Pinellas County, Florida. Herpetological Reviews 23(3):74-75.
- 55.- Jarolimek W y Misgeld U. 1997. GABA<sub>B</sub> Receptor-mediated inhibition of TTX-resistant GABA release in rodent hippocampal CA1 pyramidal cells. The Journal of Neuroscience. 17(3): 1025-1032.
- 56.- Johnston D y Wu SM. 1995. Foundations of cellular neurobiology. MIT Press. Cambridge. Mass. pp 287-391.
- 57.- Kahle JS, Cotman CW. 1993. Adenosine, L-AP4, and baclofen modulation of paired-pulse potentiation in the dentate gyrus: interstimulus interval-dependant pharmacology. Exp Brain Res 94:97-104.
- 58.- Kamatchi LG, Ticku KM. 1990. Functional coupling of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors with voltage-gated calcium channel: regulation by protein kinases A and C in cultured spinal cord neurons. Mol. Pharmacol. 38:342-347.

- 59.- Kandel ER, Schwartz JH, y Jessell TM. 2000. Principles of Neural Science. 4a Ed. McGraw-Hill USA. pp 175-298.
- 60.- Karen S, Wilcox y Dichter M. 1994. Paired Pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA<sub>B</sub> autoreceptor activation.. the journal of neuroscience. 14(3): 1775-1788.
- 61.- Katz B, y Miledi R. 1968. The effect of local blockage of motor nerve terminals. J Physiol. 199(3):729-41.
- 62.- Katz B, y Miledi R. 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. J Physiol. 207(3):789-801.
- 63.- Katz, B. 1966. Nerve, muscle and synapsis. McGraw-Hill. N.Y. pp.97-110.
- 64.- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC .1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. Trends in Neurosciences 18:527-535.
- 65.- Kenigfest N, Repérant J, Rio JP, Belekhova M, Ward R, Vesselkin N, Miceli D, y Herbin M. 1998. Retinal and Cortical Afferents to the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Turtle, *Emys orbicularis*: A Combined Axonal Tracing, Glutamate, and GABA Immunocytochemical Electron Microscopic Study. The journal of comparative neurology 391:470–490.
- 66.- Kerr DI, Ong J, Prager RH, Gynther BD, y Curtis DR. 1987. Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. Brain Res. 405(1):150-4.
- 67.- Kita H. 1993. The GABAergic circuits of the striatum. Prog. Brain Res. 99:51-72.
- 68.- Kogo N, Xing Fan T, y Ariel M. 2002. Synaptic pharmacology in the turtle accessory optic system. Exp Brain Res 47:464–472.
- 69.- Kombian SB, Zidishouski AJ, Pittman QJ. 1996. GABA<sub>B</sub> receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus in vitro, J. Neurophysiol. 76:1166-1179.
- 70.- Kriegstein A y Connors B. 1986. Cellular physiology of the turtle visual cortex: synaptic properties and intrinsic circuitry. The Journal of Neuroscience 6(1): 178-191.
- 71.- Lovinger DM, Tyler E. 1996. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. Int Rev Neurobiol. 39:77-111.
- 72.- Marín O, González A, Smeets W. 1997. Basal ganglia organization in amphibians: Efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. J. Comp. Neurol. 380:16-49
- 73.- Marín O, Smeets W, González A .1998a. Basal ganglia organization in amphibians: chemoarchitecture. Journal of Comparative Neurology. 392:285-312.
- 74.- Marín O, Smeets W, Gonzalez A. 1998b. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspectiva dabsed on recent sutiles in amphibians. Trends Neurosci. 21:487-494.
- 75.- McGeer PI y E.G. McGeer (1993) Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. Adv. Neurol. 60:93-101.
- 76.- McGeer PL, McGeer EG, Scherer U, y Singh K. 1977. A glutamatergic corticostriatal path? Brain Res. 128(2):369-73.
- 77.- Medina L, Reiner A .1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. Journal of Comparative Neurology. 342: 497-537.
- 78.- Medina L, Smeets WJAJ, Hoogland PV, Puelles L .1993. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivities in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. Journal of Comparative Neurology. 331:261-285.

- 79.- Meldolesi J., P. Volpe y T. Pozzan .1988. The intracellular distribution of calcium. *TINS* 11:449-452.
- 80.- Miller, R.J. 1998. Presynaptic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:201-227.
- 81.- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. 1995. A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors and the effects of the baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobio.* 46:423-462.
- 82.- Misgeld U, Sarvey JM, y Klee MR. 1979. Heterosynaptic postactivation potentiation in hippocampal CA 3 neurons: long-term changes of the postsynaptic potentials. *Exp Brain Res.* 37(2):217-29.
- 83.- Molina PE, Ahmed N, Ajmal M, Dewey S, Volkow N, Fowler J, y Abumrad N. 1999. Co-administration of gamma-vinyl GABA and cocaine: preclinical assessment of safety. *Life Sci.* 65(11):1175-82.
- 84.- Moratalla R, Bowery NG. 1991. Chronic lesion of cortical fibers reduces GABA<sub>B</sub> but not GABA<sub>A</sub> binding in rat caudate putamen: An autoradiographic study. *Neurochem Res.* 16:309-314.
- 85.- Morishita W, Kirov SA, Alger BE. 1998. Evidence for metabotropic glutamate receptor activation in the induction of depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal CA1. *J Neurosci.* 18(13):4870-82.
- 86.- Newberry NR, y Nicoll RA. 1984. Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 308(5958):450-2.
- 87.- Nicoll DA, Longoni S, y Philipson KD. 1990. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science.* 250:562-5.
- 88.- Nisenbaum ES, Berger TW, Grace AA. 1993. Depression of glutamatergic and GABAergic synaptic responses in striatal spiny neurons by stimulation of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors. *Synapse.* 14(3):221-242.
- 89.- Nisenbaum ES, Berger TW. 1992 a. Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs In vitro analysis. *Neuroscience.* 48: 579-593.
- 90.- Nisenbaum ES, Berger TW.1992 b. Presynaptic modulation by GABA<sub>B</sub> receptors of glutamatergic excitation and GABAergic inhibition of neostriatal neurons. *J. Physiol.* 67(2):477-481.
- 91.- Nowycky M, Mori K, y Shepherd G. 1981. GABAergic mechanisms of dendrodendritic synapses in isolated turtle olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* 46(3): 639-48.
- 92.- Pearce RA. 1993. Physiological evidence for two distinct GABA<sub>A</sub> responses in rat hippocampus. *Neuron.* 10(2):189-200.
- 93.- Penner R, Fasolato C, y Hoth M.1993. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol.* 3:368-374.
- 94.- Powers AS, Reiner A. 1980. A stereotaxic atlas of the forebrain and midbrain of the eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). *Journal für Hirnforschung.* 21:125-59.
- 95.- Princivalle AP, Pangalos MN, Bowery NG, Sperafico R. 2001. Distribution of GABA(B(1a)), GABA(B(1b)) and GABA(B2) receptor protein in cerebral cortex and thalamus of adult rats. *Neuroreport* 12: 591–595.
- 96.- Puelles L y Rubenstein JLR. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the mbryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends in Neurosciences* 16, 472±479.
- 97.- Reiner A, Medina L, Haber SN .1999. The distribution of dynorphinergic terminals in striatal target regions in comparison to the distribution of substance

- P-containing and enkephalinergic terminals in monkeys and humans. *Neuroscience*. 8:775-793.
- 98.- Reiner A, Medina L, Veenman CL .1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Research Reviews*. 28:235-285.
  - 99.- Reiner A, y Anderson KD. 1990. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Research Reviews*. 15:251-265.
  - 100.- Saint DA, Thomas T, Gage PW. 1990. GABA<sub>B</sub> agonists modulate a transient potassium current in cultured mammalian hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 118(1):9-13.
  - 101.- Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Rosello T, Pérez-Burgos A, Pérez-García E, Galarraga E, y Bargas J. 2005. A Reconfiguration of CA<sub>v</sub>2 Ca<sup>2+</sup> Channel Current and Its Dopaminergic D<sub>2</sub> Modulation in Developing Neostriatal Nuerons. *J Neurophysiol*. 94: 3771-3787.
  - 102.- Seabrook GR, Howson W, Lacey MG. 1991. Subpopulations of GABA-mediated synaptic potentials in slices of rat dorsal striatum are differentially modulated by presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors. *Brain Res*. 562:332-334.
  - 103.- Simon AM y Goudenough DA. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in Cell Biology*. 8:477-483.
  - 104.- Sivilotti L. Nistri A. 1991. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 36: 35–92.
  - 105.- Smeets W, Marín O, González A. 2000. Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *Review J. Anat*. 196:501-517.
  - 106.- Smith Y, Bevan MD, Shink E, y Bolam JP. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 86(2):353-87.
  - 107.- Smolders I, De-Klippel N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. 1995. Tonic GABAergic modulation of striatal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Eur. J. Pharmacol*. 284:83-91.
  - 108.- Soltesz I, Haby M, Leresche N, y Crunelli V. 1988. The GABA<sub>B</sub> antagonist phaclofen inhibits the late K<sup>+</sup>-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurones. *Brain Res*. 448(2):351-4.
  - 109.- Strauss P. 1986. Comparison of the effect of gamma-aminobutyric acid and its derivative baclofen on the activity of Purkinje cells of frog cerebellum in vitro. *Physiologia Bohemoslovaca* 35:289-298.
  - 110.- Sugita S, Johnson SW, y North RA. 1992. Synaptic inputs to GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors originate from discrete afferent neurons. *Neurosci Lett*. 134(2):207-11.
  - 111.- Surmeier DJ, Kita H, y Kitai ST. 1988. The expression of gamma-aminobutyric acid and Leu-enkephalin immunoreactivity in primary monolayer cultures of rat striatum. *Brain Res*. 470(2):265-82.
  - 112.- Takagi H, Somogyi P, Somogyi J, y Smith AD. 1983. Fine structural studies on 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):1-16.
  - 113.- Takahashi T, Kajikawa Y, y Tsujimoto T. 1998. G-protein coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA<sub>B</sub> receptor. *J. Neurosci*. 18:3138-3146.
  - 114.- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. 1993. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron*. 11(5):903-13.

- 115.- Thompson SM y Gähwiler BH. 1992. Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 451:329-345.
- 116.- Thompson SM, Caponga M y Scanziani M. 1993. Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 16:222-227.
- 117.- Towers S, Princivalle A, Billinton A, Edmunds M, Bettler B, Urban L, Castro-Lopes J, Bowery NG. 2000. GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12:3201–3210.
- 118.- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, y Fox AP. 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11(10):431-8.
- 119.- Vincent SR, Reiner PB. 1987. The immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the cat brain. *Brain Research.* 18:371-415.
- 120.- Wachowiak M y Cohen L. 1999. Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *The Journal of Neuroscience* 19(20):8808–8817.
- 121.- Wang W, Campaigne C, Ghosh B, Ulinski P. 2005. Two Cortical Circuits Control Propagating Waves in Visual Cortex. *Journal of Computational Neuroscience* 19:263–289.
- 122.- Wheeler D.B.; A. Randall y R.W. Tsien. 1994a. Roles of N-type and Q-type  $Ca^{2+}$  channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 264:107-111.
- 123.- Wheeler D.B.; R.W. Tsien y A. Randall. 1994b. Identification of calcium channels that control neurosecretion. *Science.* 266:828-831.
- 124.- Williams EJ, Doherty P, Turner G, Reid RA, Hemperly JJ, Walsh FS. 1992. Calcium influx into neurons can solely account for cell contact-dependent neurite outgrowth stimulated by transfected L1. *J Cell Biol.* 119(4):883-92.
- 125.- Wilson C. 1998. The Basal Ganglia. In: Shepherd, G.M. (Ed) *The synaptic organization of the brain.* 4ª Ed. Oxford University press. N.Y. pp 329-375.
- 126.- Woolf NJ .1991. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology.* 37:475-524.
- 127.- Wu LG, y Saggau P. 1997. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends of Neurosci.* 20:204-212.
- 128.- Zimmerman H. 1993. *Synaptic transmission, cellular and molecular basis.* Oxford University Press. N.Y. pp 111-117.