

03062

1  
20



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO  
UACPyP  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

**LAS CORRIENTES DE POTASIO ACTIVADAS POR  
LA ENTRADA DE CALCIO EN LAS NEURONAS  
NEOESTRIATALES DE PROYECCION**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN INVESTIGACION**

**BIOMEDICA BASICA**

**P R E S E N T A:**

**BIOL. GABRIELA XOCHITL AYALA MENDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE BARGAS DIAZ**

**MEXICO, D. F.**

**1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

263941



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz. Durante el desarrollo experimental se contó con el apoyo económico otorgado por la DGAPA.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Quiero expresar mis agradecimientos al Dr. José Bargas Díaz y a la Dra. Elvira Galarraga Palacio (mis tutores) por toda su ayuda, consejos, apoyo y paciencia que me han brindado desde que yo ingrese al laboratorio cuando apenas iniciaba mi Servicio Social. Muchas gracias por enseñarme como se debe trabajar cuando se escoge la carrera científica!.**

**A los sinodales:**

**Dra. Laura Escobar Pérez  
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia  
Dr. Miguel Morales Mendoza  
Dr. Luis Vaca Domínguez**

**Por sus valiosas observaciones y sugerencias para la edición final del presente trabajo.**

## **DEDICO ESTA TESIS.**

**Con todo mi amor a mis padres Miguel Ayala González y Angela Méndez, gracias por su cariño, apoyo y confianza que siempre han tenido en mí. Les debo todo. Nunca los defraudare.**

**A todos mis hermanos Miki, Marina, Coquis, Memo, Cheli, Mayo, Yolis y Betito. Porque siempre estamos juntos en las buenas y en las malas. Que buena onda!**

**A todos mis pequeñitos: Iriana, Rene, Jony, Norma, Diana, Ivan, Miguel, Israel, Itzayana, Mayra, Armandito, Laura, Chiqui, Brenda, Cinthya y Sandy. Aunque a veces son tremendamente traviesos, son un encanto. Los adoro.**

**A mis amigos y amigas de toda la vida: Gabino, Fabian, Norma, Ma. Carmen, Martha, Josefina, Veronica, Liliana, ELizabeth y Chuy. Porque aun con el paso del tiempo, tratamos siempre de mantenernos en contacto y no dejar en el olvido la gran amistad que nos une.**

**A mis compañeros del laboratorio Jaime, Silvia, Toño por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido juntos en esa nuestra segunda casa, el laboratorio 125- Norte.**

**A Carmen Vilchis por su valiosa amistad que me ha brindado y por los momentos agradables y a veces difíciles que hemos compartido juntas cuando hacemos experimentos. Muchas gracias.**

**A Juanito, porque siempre nos tiene listo todo el equipo y material para nuestro trabajo, además del cafecito y la música alegre. Gracias por consentirnos!**

# INDICE

## INTRODUCCION

Las conductancias iónicas y el disparo neuronal .....	1
El neocortico .....	2
El patrón temporal de disparo de las neuronas espinosas medianas .....	3
El postpotencial hiperpolarizante .....	6
Los canales de potasio dependientes de calcio .....	7
Clasificación de los canales de potasio activados por calcio .....	9
Canales de alta conductancia (BK ó MAXI K) .....	9
Canales de baja conductancia (SK ó MINI K).....	9
Canales de conductancia intermedia (IK) .....	10
Canales de potasio activados por calcio transitorios .....	10
Bloqueadores de los canales BK .....	10
Estructura molecular de los canales BK .....	12
Estructura molecular de los canales SK .....	15
El papel fisiológico de los canales de potasio dependientes de calcio .....	16
Modulación de los canales de potasio activados por calcio .....	17

<b>OBJETIVO</b> .....	19
-----------------------	----

## METODO

Obtención de las neuronas disociadas .....	20
Registro electrofisiológico .....	21

## RESULTADOS

Efecto del bloqueador 4-aminopiridina sobre la corriente saliente .....	23
Efecto del cadmio sobre la corriente saliente .....	24

Efectos de las toxinas caribdotoxina e iberiotoxina .....	24
La apamina bloquea canales de potasio dependientes de calcio tipo SK .....	25
El efecto aditivo de las toxinas .....	25

## **DISCUSION**

Papel de la corriente transitoria en las neuronas neocorticales .....	35
Efecto del $Cd^{2+}$ y TEA en las corrientes salientes en presencia de 4- AP .....	36
Tipos de canales de potasio activados por calcio y su papel fisiológico .....	38
Canales de potasio de alta conductancia .....	38
Canales de potasio de baja conductancia .....	39
Efecto aditivo de los bloqueadores de los canales de $K(Ca^{2+})$ .....	41

<b>CONCLUSIONES</b> .....	43
---------------------------	----

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	45
---------------------------	----

## RESUMEN

Los canales de potasio activados por la entrada de calcio son de gran importancia en la generación del postpotencial hiperpolarizante que regula el patrón y frecuencia de disparo en las neuronas neocorticales, así como en varios otros tipos neuronales (Sah, 1996).

En el presente trabajo se caracterizaron las corrientes de potasio activadas por la entrada de calcio  $K(Ca^{2+})$  presentes en las neuronas neocorticales. Para esto, se realizaron registros de fijación de voltaje en la modalidad de célula entera en neuronas neocorticales disociadas con pronasa E tipo XIV.

Los registros se realizaron en presencia de TTX y 4AP para eliminar las corrientes de sodio y de potasio transitorias y obtener solo la corriente saliente persistente.

La porción de la corriente sensible a la 4-aminopiridina (4-AP 3 mM) es de  $35.2 \pm 3.8\%$  ( $n=25$ ).

En estas condiciones, se observó que el  $53.1 \pm 4.2\%$  ( $n=18$ ) de la corriente saliente persistente es sensible al  $Cd^{2+}$  ( $400 \mu M$ ) lo que sugirió la presencia de corrientes de  $K(Ca^{2+})$  en estas neuronas.

Se utilizaron toxinas específicas para identificar los tipos de canales de  $K(Ca^{2+})$ .

La caribdotoxina, bloqueador de los canales de  $K(Ca^{2+})$  del tipo BK disminuyó un  $34.3 \pm 5\%$  ( $n=14$ ) la corriente saliente persistente. La iberiotoxina, un bloqueador con mayor selectividad para los canales BK disminuyó un  $29.2 \pm 4.6\%$  ( $n=14$ ) la corriente. No se encontraron diferencias significativas entre ambas toxinas.

La apamina, un péptido selectivo para los canales de  $K(Ca^{2+})$  del tipo SK redujo la corriente persistente en un  $25.4 \pm 4.6\%$  ( $n=12$ ).

La adición consecutiva de caribdotoxina y apamina reduce la corriente saliente en un porcentaje similar encontrado con el cadmio sin embargo, la adición posterior de cadmio reduce un porcentaje adicional de la corriente saliente. Resultados similares se obtuvieron invirtiendo el orden de adición de las toxinas.

Estos resultados sugieren la presencia de canales de potasio dependientes de calcio del tipo BK, SK y probablemente del tipo IK en las neuronas neocorticales.



# INTRODUCCION

## Las conductancias iónicas y el disparo neuronal

El código de información del sistema nervioso se basa en la generación y propagación de potenciales de acción. El potencial de acción fue descrito cuantitativamente en 1952 por Hodgkin y Huxley en el axón gigante de calamar usando la técnica de fijación de voltaje que permitió describir las conductancias iónicas que generaban la despolarización transitoria de la membrana celular. Actualmente se sabe que una corriente entrante de sodio sensible a tetrodotoxina genera la fase de despolarización del potencial de acción y que una corriente saliente de potasio, del tipo "rectificador retardado", así como la inactivación de los canales de sodio, son responsables de la repolarización del potencial de acción.

Mientras que el axón es una estructura relativamente sencilla cuya función es la conducción del potencial de acción, en las neuronas existe gran diversidad de canales iónicos en las dendritas y en el soma, donde se integra la información de las diferentes aferentes que hacen sinapsis con ellas. En las terminales presinápticas existen diferentes tipos de canales iónicos que participan en el proceso de liberación del neurotransmisor.

Esta diversidad de canales iónicos participa en la integración sináptica, el potencial de reposo, y la generación de potenciales subumbrales, que al llevar a la membrana celular al umbral de disparo genera potenciales de acción utilizando diferentes tipos de conductancias a potasio que participan en la repolarización del mismo, y no solo el rectificador retardado, como en el axón gigante de calamar.

Cada tipo celular presenta un patrón temporal de disparo característico, así algunas neuronas disparan potenciales de acción de manera tónica, otras pueden presentar periodos de silencio, disparar ráfagas de potenciales de acción, algunas más presentan potenciales marcapaso y otras exhiben adaptación o cambian su patrón de disparo dependiendo del potencial de membrana.

Los patrones temporales de disparo son generados por los diferentes tipos de canales iónicos presentes en las células, los cuales pueden generar corrientes transitorias o persistentes

con diferente sensibilidad al voltaje, umbrales de activación e inactivación, con sensibilidad al calcio, ATP y fármacos. Además, estos canales pueden ser modulados por varios tipos de mensajeros intracelulares para dar una respuesta celular determinada.

Así, por ejemplo, las neuronas talámicas presentan un patrón de disparo en ráfagas cuando se encuentran en un potencial de membrana hiperpolarizado. Estas ráfagas se generan por la activación de una corriente T transitoria de calcio que lleva la membrana celular al umbral de disparo para generar potenciales de acción de sodio y potasio. Cuando la corriente de calcio se inactiva, el disparo se detiene. Sin embargo si el potencial de membrana es más despolarizado, la corriente T esta inactivada y el disparo celular se vuelve tónico (McCormick, 1998).

En la mayoría de las neuronas, la repolarización del potencial de acción, la frecuencia de disparo y el intervalo interespiga son regulados principalmente por corrientes salientes de potasio (Jan y Jan, 1997).

Las corrientes transitorias ( $I_A$ ) que se activan a voltajes cercanos a  $-60$  mV participan en la latencia de disparo. Su activación hace que la membrana se despolarice lentamente para llegar al umbral de disparo, y se genere la primera espiga. Estos canales se inactivan, pero la repolarización del potencial de acción remueve la inactivación, lo que da lugar a la participación de estos canales en el intervalo interespiga durante el disparo neuronal. Además enlentecen la frecuencia de disparo durante despolarizaciones prolongadas. Otros canales transitorios de potasio se activan a voltajes más despolarizados ( $-45$  mV) y participan en la repolarización rápida del potencial de acción.

### **El neostriado**

El neostriado es un componente de los ganglios basales, que son un conjunto de núcleos subcorticales relacionados con la generación y ejecución de movimientos voluntarios. Esta formado por los núcleos caudado, putamen y acumbens. Recibe entradas sinápticas glutamatérgicas de las áreas motoras, sensoriales y de asociación de la corteza cerebral, de los núcleos intralaminares del tálamo, del núcleo basolateral de la amígdala, así como entradas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y entradas serotonérgicas del núcleo raquídeo

dorsal. A su vez, el neostriado proyecta aferentes hacia otros núcleos de los ganglios basales, como son el globo pálido interno y externo y la sustancia nigra pars reticulata (Wilson, 1998).

La neurona principal del neostriado es la neurona espinosa mediana. Se le llama así por presentar gran número de espinas dendríticas. Representa el 95% de la población celular en este núcleo. Tiene un diámetro de 12-20  $\mu\text{M}$ , y presenta ramificaciones dendríticas que radian hacia todas direcciones desde el cuerpo celular. Estas neuronas son gabaérgicas (Wilson, 1998).

En este núcleo se tienen caracterizadas por lo menos 9 tipos diferentes de interneuronas, (Chang et al., 1982) de las cuáles ya se caracterizaron tres tipos con base en estudios de inmunocitoquímica; por contenido de neurotransmisor y de péptidos. Estas son la interneurona gigante colinérgica, las células de canasta que contienen parvalbúmina y las interneuronas somatostatina/ óxido nítrico sintetasa. Estas dos últimas interneuronas son gabaérgicas (Kawaguchi, 1996).

Las sinapsis principales en el neostriado son las sinapsis axodendríticas establecidas por las aferentes de la corteza cerebral y el tálamo con las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas. Estas sinapsis son el 85% de todas las sinapsis presentes en el neostriado (Kemp y Powell, 1971 a,b). También existen sinapsis inhibitorias mediadas por el receptor  $\text{GABA}_A$  establecidas entre las dendritas y los axones de las neuronas espinosas medianas, así como sinapsis de las neuronas espinosas medianas con las interneuronas gabaérgicas y colinérgicas.

### **El patrón temporal de disparo de las neuronas espinosas medianas**

En registros *in vitro* con fijación de corriente, se observa que la aplicación de pulsos despolarizantes de corriente de baja intensidad genera una rampa despolarizante con una duración de cientos de milisegundos a segundos, al final de la misma se observa el disparo del primer potencial de acción (Bargas et al., 1989; Surmeier et al., 1992). Cuando se aumenta la amplitud de los pulsos de voltaje, se incrementa la frecuencia de disparo y dependiendo del potencial de membrana se observa o no la adaptación de la frecuencia del disparo (Pineda et al., 1992).

En registros de fijación de corriente a un potencial de mantenimiento de -60 mV se observan dos componentes en el postpotencial que sigue a un potencial de acción, un componente rápido con una duración de pocos milisegundos y uno lento de 250 ms o más. Ambos

componentes son sensibles a  $Ca^{2+}$ , ya que la adición de  $Cd^{2+}$  (100  $\mu M$ ) disminuye ambos postpotenciales y aumenta la frecuencia de disparo (Figura 1).

La caribdotoxina, el  $Cd^{2+}$  y el TEA retardan la repolarización del potencial de acción (PA) lo que sugiere que conductancias de  $K^+$  activadas por calcio  $K$  ( $Ca^{2+}$ ) del tipo BK podrían participar en la repolarización rápida del potencial de acción. La adición de apamina no tiene efecto en la repolarización del PA. Sin embargo, la apamina si disminuye significativamente el postpotencial lento y aumenta la frecuencia de disparo, lo que sugiere que los canales  $K$  ( $Ca^{2+}$ ) del tipo SK podría participar en la generación de este postpotencial.

(Lancaster y Adams 1986; Pineda et al., 1992) (Figura 1).

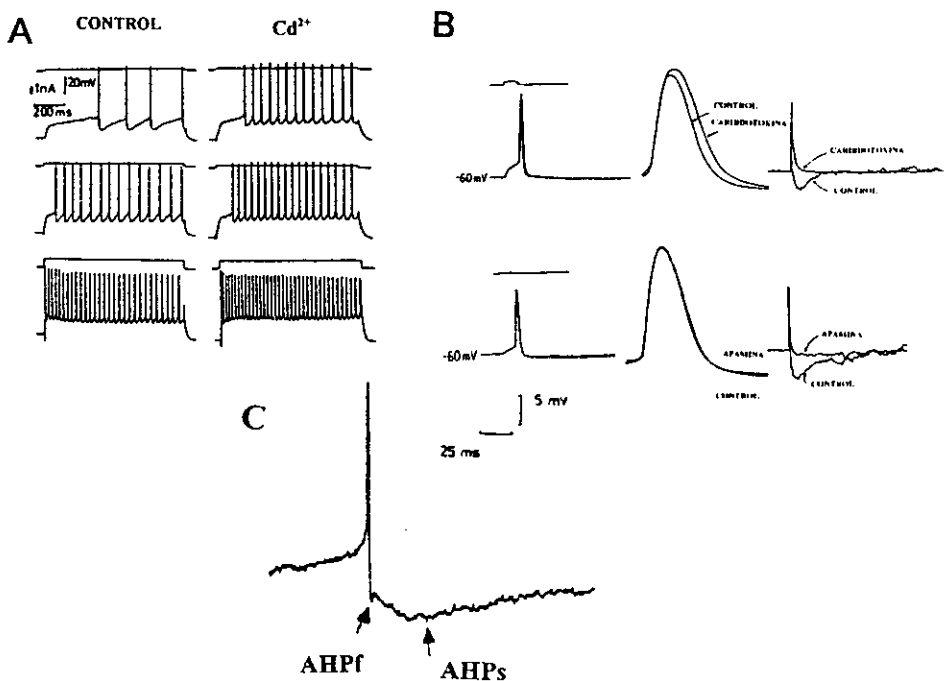


Figura 1.

(A) Efecto del cadmio sobre la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas.

Los registros se realizaron a un potencial de membrana de -60 mV con pulsos de voltaje de 1 seg de duración y amplitudes de 0.83-0.92 nA. La adición de 50  $\mu M$  de cadmio aumenta la frecuencia de disparo. (B) La caribdotoxina, (CTX) retarda la repolarización del potencial de acción y disminuye el postpotencial hiperpolarizante en los primeros potenciales de acción.

La apamina no tiene efecto en la repolarización del potencial de acción, pero si disminuye el postpotencial hiperpolarizante, y aumenta la frecuencia de disparo (No se muestra).

(C) El postpotencial rápido (AHPf) y el postpotencial lento (AHPs) en las neuronas neocorticales.

Tomado de Pineda et al, (1992).

Los ganglios basales están relacionados con algunas neuropatologías relacionadas con el control de los movimientos voluntarios, como es la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington (Wilson, 1998).

En el tratamiento de la enfermedad de Parkinson se utilizan antagonistas a receptores colinérgicos muscarínicos así como mecanismos para inducir la elevación de los niveles endógenos de dopamina o agonistas dopaminérgicos (Calne, 1980), mientras que en la enfermedad de Huntington se utilizan agonistas colinérgicos (Aquilonius et al., 1971). Esto llevo a pensar que existe un "equilibrio" dopamina-acetilcolina en el funcionamiento normal de el neocstriado.

El postpotencial hiperpolarizante en estas neuronas es regulado de manera antagónica por la acetilcolina y la dopamina. Los agonistas colinérgicos reducen la amplitud del postpotencial a través de receptores muscarínicos tipo M1, por la vía de la fosfolipasa C y la activación de la proteína cinasa C. La dopamina aumenta la amplitud del mismo por medio de receptores D<sub>1</sub> acopados a la vía de la proteína cinasa A dependiente de AMPc, al parecer por la activación del canal de calcio tipo L (Pineda et al., 1992, 1995; Hernández-López et al., 1996).

En las células del neocstriado se encuentran presentes los canales de calcio de alto umbral tipos N, P, L, Q y R (Bargas et al., 1994).

El receptor M1 se encuentra fuertemente asociado a la vía de la fosfolipasa C, mientras que el receptor M4 inhibe a la adenilato ciclasa (Peralta et al., 1988). La activación de estos receptores muscarínicos reduce las corrientes de calcio de los tipos L, N y P/Q en las neuronas estriatales (Howe y Surmeier, 1995), así como en las neuronas del hipocampo (Toselli et al., 1989).

La activación de los receptores D<sub>1</sub> reduce las corrientes de calcio tipo N y P a través de la vía del AMPc, y aumenta la corriente de calcio tipo L (Surmeier et al., 1995).

Estas evidencias sugieren la participación de la dopamina y de la acetilcolina en la modulación de las corrientes de potasio y de calcio para la regulación del patrón y la frecuencia de disparo de las neuronas neocstriatales; donde participan de manera importante los canales de potasio dependientes de calcio (Pineda et al., 1992; Hernández-López et al., 1996).

## El postpotencial hiperpolarizante

La frecuencia de disparo y el intervalo interespiga están en gran medida regulados por canales de potasio dependientes de calcio ( $K^{Ca^{2+}}$ ). Estos canales de potasio se activan por la entrada de calcio durante la generación del potencial de acción, su activación genera el postpotencial hiperpolarizante (Sah 1996; McCormick, 1998).

Existen dos tipos principales de postpotencial hiperpolarizante. Uno rápido que dura unos pocos milisegundos probablemente generado por canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia ó "BK". Durante la repolarización rápida del potencial de acción estos canales se activan y repolarizan rápidamente a la membrana celular, llevándola a valores más negativos que el potencial umbral generando el postpotencial rápido. La corriente iónica que generan estos canales se conoce como  $I_C$  y es sensible al calcio intracelular y al voltaje (Sah 1996; McCormick, 1998).

El postpotencial lento es muchas veces generado por canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia ó "SK". Estos canales presentan mayor sensibilidad al calcio que los BK, ya que se activan a concentraciones nanomolares y generan el postpotencial lento que le sigue a un solo potencial de acción o a un grupo de ellos. La corriente que generan estos canales se llama  $I_{AHP}$ , ya que activa al postpotencial hiperpolarizante lento. El postpotencial tiene una duración de cientos de milisegundos hasta segundos y su curso temporal es el que determina el patrón de disparo de varios tipos neuronales. Los canales SK participan en la adaptación de la frecuencia de disparo: una despolarización prolongada provoca un tren de potenciales de acción pero los intervalos interespiga aumentan progresivamente, hasta que la generación de potenciales de acción se detiene, esto se observa en las neuronas piramidales del hipocampo (Madison y Nicoll 1986).

En algunos casos, con base en los cursos temporales, los postpotenciales se clasifican en rápidos, medios, y lentos los cuales pueden ser activados por conductancias de potasio dependientes de calcio u otros tipos de conductancias de potasio, como es el rectificador anómalo en las neuronas corticales (Lorenzon y Foehring, 1992) o en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en donde solo el postpotencial rápido y el lento son generados por conductancias de potasio dependientes de calcio (Storm 1987).

El postpotencial hiperpolarizante es blanco de múltiples tipos de neuromoduladores que regulan la frecuencia y el patrón de disparo neuronal, ya que en muchos casos reducen la amplitud del postpotencial hiperpolarizante, aumentando la excitabilidad (Sah 1996).

Es por esta razón que el estudio de los canales de potasio dependientes de calcio es importante para conocer los mecanismos relacionados con el disparo neuronal, así como los factores que determinan el curso temporal del postpotencial y de la corriente  $I_{AHP}$ .

### Canales de potasio dependientes de calcio

Los canales de potasio dependientes de calcio se descubrieron por primera vez en la membrana celular de los eritrocitos incubados con fluoruro. Se observó la salida de potasio en presencia de calcio externo, el cual se bloqueó cuando se adicionaba EDTA ó EGTA. A este fenómeno se le llamó el "efecto Gardos" (Hinrichsen, 1993 ).

Posteriormente, la microinyección de calcio en neuronas de *Aplysia* produjo una hiperpolarización en el potencial de membrana. El potencial de equilibrio de esta hiperpolarización se encontró directamente relacionado con la concentración externa de potasio. Estas evidencias sugirieron la activación de una corriente de potasio saliente activada por calcio. Se le asoció a la actividad marcapaso de la generación de ráfagas de potenciales de acción (Meech y Strumwasser, 1970).

En las células de vertebrados superiores también se encontraron conductancias de K ( $Ca^{2+}$ ). En las motoneuronas de rana (Barrett y Barrett, 1976) se demostró que el postpotencial hiperpolarizante depende de la presencia de calcio en el medio (Figura 2A). En las motoneuronas del cobayo se observó que al aumentar el número de espigas y con esto la entrada de calcio, la amplitud del postpotencial aumentó (Figura 2C). Con la aplicación de pulsos de corriente largos, se observó adaptación y un postpotencial lento de varios segundos de duración (2D), la adición de cadmio abolió la adaptación y el postpotencial lento (Fig. 2E).

Los mecanismos que dan lugar al postpotencial lento son complejos, y comprenden la entrada de calcio, su difusión y amortiguamiento, la unión de los iones  $Ca^{2+}$  con los canales de potasio, así como la recaptura del  $Ca^{2+}$  hacia las pozas intracelulares (Hille 1992).

Los canales de potasio activados por calcio presentan una distribución ubicua. Se han encontrado desde los organismos unicelulares como *Paramecium* y *Saccharomyces* hasta en múltiples tipos celulares de vertebrados superiores (Hinrichsen, 1993 ).

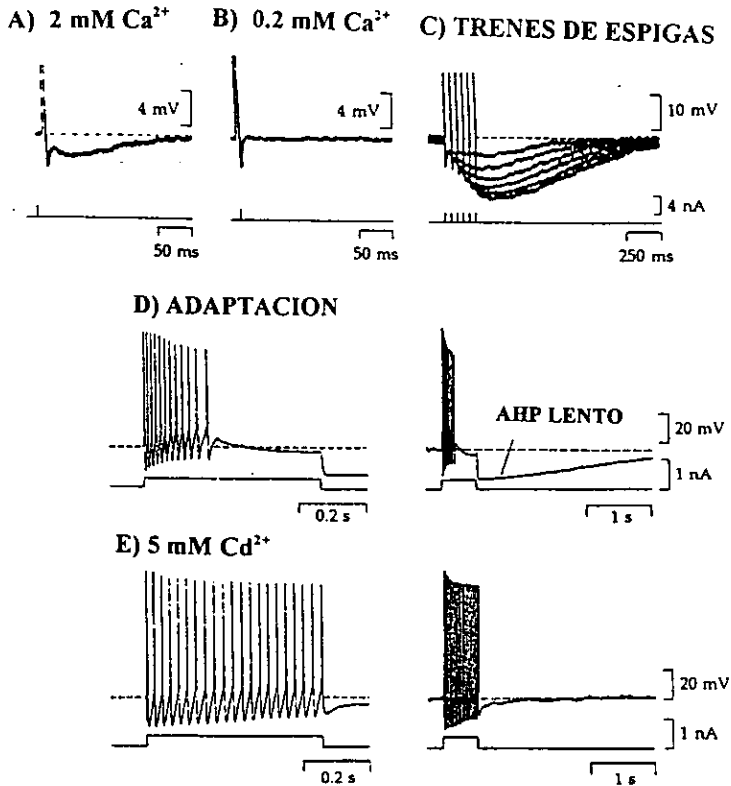


Figura 2.

(A) El postpotencial rápido y lento de las motoneuronas de la rana.

(B) El postpotencial lento registrado en las motoneuronas de rana se abole cuando se reduce la concentración externa de calcio de 2.0 a 0.2 mM.

(C) En las motoneuronas del cobayo se observa que al aumentar el número de potenciales de acción, la amplitud y la duración del postpotencial hiperpolarizante aumenta.

(D) Las motoneuronas del cobayo presentan adaptación cuando se aplican pulsos largos de corriente, así como un postpotencial lento de varios segundos de duración.

(E) Con la aplicación de Cd<sup>2+</sup> (5 mM), se abole la adaptación y el postpotencial lento.

Tomado de Barrett et al., 1976 e Yarom et al., 1985.



## **Clasificación de los canales de potasio activados por calcio**

Estos canales se han clasificado de acuerdo a sus conductancias unitarias, a su sensibilidad al calcio y a distintos fármacos, así como a sus cinéticas de activación e inactivación. Con base en estas características, se tienen las siguientes familias:

### **Canales de alta conductancia (BK ó MAXI K)**

Estos canales presentan conductancias de 130 a 300 pS en condiciones simétricas de KCl. Son dependientes de calcio y voltaje. Con la despolarización y el aumento en la concentración interna de calcio, aumenta la probabilidad de apertura de los mismos (Barrett et al., 1982). Se activan con concentraciones 1-10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  a potenciales de membrana cercanos a -50 y -70 mV y son sensibles a péptidos aislados de escorpiones como son la caribdotoxina, iberiotoxina (Sah, 1996) kaliotoxina y noxiustoxina (Crest et al., 1992; Carbone et al., 1982), así como a paxilline, penitrem A y verruculogeno que son alcaloides diterpenos indol de los hongos *Penicillium paxilli*, *P. Palitans* y *P. verruculosum* respectivamente (Knaus et al., 1994).

Se ha observado en células de hipocampo en cultivo y en células pilosas de tortuga, que una concentración de 4  $\mu\text{M}$  de calcio es necesaria para una activación media ( $K_{50}$ ) a 0 mV (Francionili 1988). Mientras que en células del músculo liso se necesita solo 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  (Benham et al., 1996). Por otro lado, en las terminales nerviosas de la pituitaria posterior, concentraciones de calcio menores a 250 nM son necesarias para la activación media de los canales de potasio dependientes de calcio a 0 mV (Bielefeldt y Jackson, 1993).

### **Canales de baja conductancia (SK ó MINI K)**

Estos canales tienen conductancias entre 5 -20 pS en condiciones simétricas de KCl. No presentan dependencia al voltaje, y son sensibles a la apamina y la tubocurarina (Kohler et al., 1996). Son muy sensibles al calcio intracelular ya que se activan a concentraciones de 100-400 nM (Sah, 1996).

### **Canales de conductancia intermedia (IK)**

Es un grupo muy diversificado de canales iónicos. Estos canales se encuentran poco caracterizados y se desconoce su posible papel fisiológico.

Poseen conductancias unitarias que van desde 25 hasta 135 pS, dependiendo del tipo neuronal y la especie estudiada. Son sensibles a bajas concentraciones de TEA. En el cerebro de rata, se ha observado que la caribdotoxina bloquea estos canales. Son insensibles a la apamina (Reinhart et al., 1989).

### **Canales transitorios de potasio activados por calcio**

En las células cromafines de la rata se han descrito corrientes transitorias de potasio activadas por calcio cuando se aplican pulsos despolarizantes de voltaje a concentraciones constantes de calcio. La relación corriente-voltaje muestra la típica forma N descrita en las células cromafines de los bovinos (Marty y Neher, 1985). Estas corrientes son sensibles a la apamina y a concentraciones bajas de TEA, lo que sugiere que la corriente saliente presenta canales de potasio activados por calcio del tipo BK y SK (Neely y Lingle, 1992). Al parecer la inactivación de estos canales es dependiente de voltaje y del calcio .

En registros unitarios de este tipo celular se han encontrado canales de  $K(Ca^{2+})$  de alta conductancia que se inactivan y se les conoce como  $BK_i$  (Solaro y Lingle 1992; Solaro et al., 1995). El mecanismo de inactivación es semejante al de la "bola-cadena" descrito inicialmente en los canales de potasio activados por voltaje (rev. Lingle et al., 1996).

### **Bloqueadores de los canales BK**

Los canales de potasio tipo BK generan una corriente saliente denominada  $I_C$ . Esta corriente presenta activación rápida y en ocasiones una inactivación también rápida entre 1-2 y 50-150 ms, respectivamente (Johnston y Sin Wu 1996).  $I_C$  es sensible a bajas concentraciones de tetraetilamonio (TEA <1 mM) aplicado externamente; la  $K_d$  reportada es de 0.3 mM (Villaroel et

al., 1988; Blatz y Magleby, 1984). Además, altas concentraciones de calcio y bario pueden bloquearlos (Vergara y Latorre, 1983).

Se conocen varios péptidos que se utilizan para la caracterización farmacológica de los canales BK, los más conocidos son la caribdotoxina y la iberiotoxina.

La caribdotoxina (CTX) es un péptido aislado del escorpión israelí *Leiurus quinquestriatus hebraeus* que bloquea irreversiblemente a estos canales a concentraciones nanomolares.

Este péptido tiene 37 aminoácidos principalmente básicos, lo que le da una carga neta de +5 a pH 7 y está formado por tres hebras  $\beta$ -plegadas, una  $\alpha$ -hélice y un fragmento extendido, todos ellos unidos por tres puentes disulfuro (Bontems et al., 1991, 1992). La constante de disociación reportada para el bloqueo de estos canales en el músculo esquelético es de 3.5 nM, y en el músculo liso de la aorta es de 2.1 nM (Smith et al. 1986). Esta toxina se une al canal en estado abierto o cerrado, presentando mayor afinidad por el estado abierto. Su efecto de bloqueo depende de las condiciones iónicas presentes, ya que cuando hay un aumento en la concentración externa de potasio o sodio, disminuye la afinidad de la toxina por el canal. Adicionalmente, la unión de la caribdotoxina con el canal es dependiente de voltaje, ya que la despolarización acelera la disociación de la toxina (Anderson et al., 1988).

La aplicación externa de caribdotoxina bloquea la boca externa del canal de potasio dependiente de calcio y el aumento de la concentración interna de potasio disminuye la afinidad de la toxina por el canal, lo que sugiere que la salida de los iones potasio desprenden a la toxina del canal y por lo tanto la constante de disociación aumenta (MacKinnon y Miller 1988; Hinrichsen, 1993). La caribdotoxina puede bloquear canales de potasio dependientes de voltaje como lo es el K<sub>v</sub> 1.3 (Miller et al., 1985; Stuhmer et al., 1989).

La iberiotoxina es un péptido purificado del escorpión *Buthus tamulus* y presenta un 68% de identidad con la caribdotoxina. Presenta mayor cantidad de aminoácidos ácidos con carga negativa, como el ácido aspártico, lo que le da una carga neta igual a +1. Los canales tipo BK presentan mayor afinidad por la iberiotoxina, con una constante de disociación de 1 nM (Latorre 1994). Su efecto no depende de las condiciones iónicas presentes. En el músculo liso, se ha encontrado una IC<sub>50</sub> de 250 pM cuando se aplica externamente (Giangiacoimo et al., 1992).

Existen otros bloqueadores no selectivos de los canales Maxi K, como es el caso de la Kaliotoxina, un péptido purificado del escorpión *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, que presenta un 44% de homología con la caribdotoxina y la iberiotoxina y bloquea canales Maxi K de neuronas simpáticas de conejo y canales IK de neuronas de *Helix* (Crest et al., 1992). La noxiustoxina, un péptido del escorpión *Centruroides noxius* que inhibe canales BK en músculo liso así como canales de potasio dependientes del voltaje (Carbone et al., 1982).

### Estructura molecular de los canales BK

La localización cromosómica de los canales BK se realizó primero en el locus *slo* de *Drosophila*, en donde se encontró que el polipéptido codificado presenta similitud con los canales de potasio dependientes de voltaje. Además posee una región carboxilica con dos posibles segmentos transmembranales, importantes para la sensibilidad al calcio (Atkinson et al., 1991).

Posteriormente, por estudios de DNA complementario del gen mSlo aislado del cerebro y músculo del ratón y expresado en ovocitos de *Xenopus*, se identificó y secuenció el canal mSlo.

Se encontraron nueve transcritos diferentes posiblemente originados por partición alternativa, lo que podría explicar las diferencias en la sensibilidad al calcio y al voltaje que presentan estos canales en los diferentes tipos celulares (Butler et al., 1993).

El canal mSlo tiene 1196 aminoácidos, aproximadamente el doble de tamaño que un canal de potasio dependiente de voltaje (Schwarz et al., 1988).

Los canales presentan 6 segmentos transmembranales (S1-S6), con la región "P" del poro de conducción iónica entre los segmentos S5-S6 semejante a los canales de potasio dependientes de voltaje (Jan y Jan 1992;1997, Pongs 1992, Durell y Guy, 1992). Sin embargo, existen evidencias de que los canales BK presentan otro segmento transmembranal en la región amino terminal llamado S0, importante en la regulación del canal por la subunidad  $\beta$  (Wallner et al., 1996). Además, presentan 4 segmentos adicionales S7-S10 que tienen 60% de identidad con el gen de *Drosophila* dSlo. La región S9-S10 es importante para la sensibilidad al calcio (Wei et al., 1994) (Fig 3).

En el cerebro del humano, se han encontrado 9 isoformas de canales de  $K(Ca^{2+})$ , derivados de partición alternativa del gen hSlo localizado en la banda q22.3 del cromosoma 10. Las

modificaciones de los canales se encontraron principalmente en los extremos carboxílicos, regiones importantes para la sensibilidad al calcio (Tseng-Crank, 1994).

Se conoce que cuatro subunidades forman el canal funcional. En experimentos donde se coinyectaron subunidades de transcriptos del gen Shaker nativo y mutado (se mutó un solo aminoácido en una región de unión a la caribdotoxina) se encontró que la estequiometría de la unión de la toxina con las subunidades del canal era de 1:1, encontrándose un valor de 4 por canal, lo que apoya la presencia de 4 subunidades para tener un canal funcional (MacKinnon, 1991).

Posteriormente, por estudios de purificación bioquímica usando cromatografía y centrifugación en gradientes de sacarosa, se aislaron canales Maxi K en el músculo liso de la tráquea de bovinos. Se encontró que este canal está formado por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$  (García Calvo et al., 1994). La subunidad  $\alpha$  es la que forma el poro iónico del canal y la subunidad  $\beta$  es regulatoria. Ambas subunidades se encuentran unidas, ya que al utilizar anticuerpos contra la subunidad  $\alpha$  y posteriormente realizar la inmunoprecipitación, se encuentran presentes las dos subunidades, lo que demuestra que existen uniones no covalentes entre ellas (Knaus et al., 1994). Las subunidades presentan estequiometría 1:1 y se propone que el canal funcional es un heteromultímero formado por 4 subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , resultados consistentes con la estructura tetramérica de los canales de potasio dependientes de voltaje (García Calvo et al., 1994).

Los registros electrofisiológicos realizados en ovocitos de *Xenopus* en donde se coexpresaron las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  provenientes del músculo liso de bovino, mostraron que el canal presenta mayor sensibilidad al voltaje y a la concentración de calcio para su activación, comparado con el canal formado solamente con la subunidad  $\alpha$  (McManus 1991, 1995). Esto indica que la subunidad  $\beta$  regula la activación de los canales BK aumentando la sensibilidad a los cambios de calcio y de voltaje de la subunidad  $\alpha$ .

En el cerebro del humano se clonó y expresó la subunidad  $\beta$  derivada del gen *hslo $\beta$* , localizado en la banda q34 del cromosoma 5. Se encontró un 85% de identidad con la subunidad  $\beta$  de bovino. La subunidad está formada por 191 aminoácidos, con dos regiones hidrofóbicas que probablemente son transmembranales. Se encuentra altamente expresado en el hipocampo, el cuerpo calloso, así como en el músculo liso (Tseng Crank et al., 1996).

Por otro lado, en estudios realizados en cerebro de rata y la unión neuromuscular, se encontró que los canales BK están localizados en las terminales presinápticas. Con las técnicas de hibridación *in situ* y de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra la región S9-S10 del canal Maxi K, se encontraron altos niveles de RNA mensajero (RNAm) de la proteína *slo* en la neocorteza, las células granulares y piramidales del hipocampo, en el núcleo medial habenuar, y en las células de Purkinje del cerebelo. En los ganglios basales, el RNAm se encuentra en el neocestriado, mientras que la inmunoreactividad se encuentra en el globo pálido, la sustancia nigra pars reticulata y el núcleo entopeduncular. Esto sugiere que estos canales son sintetizados en el soma de las neuronas del estriado y posteriormente transportados hacia las terminales axónicas que justamente proyectan hacia los núcleos ya mencionados ( Knaus et al, 1996).

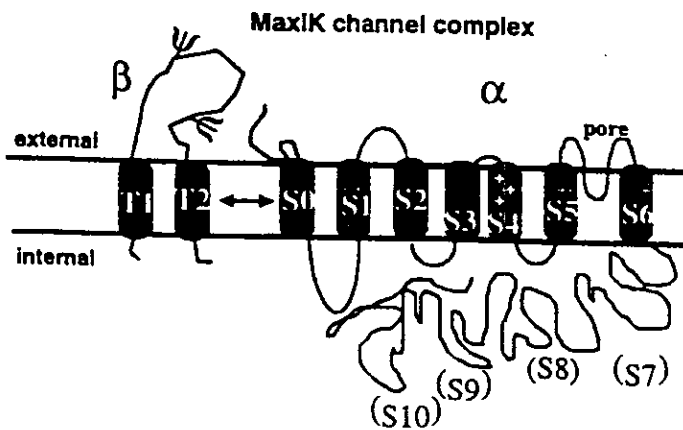


Figura 3.

Diagrama esquemático de la estructura molecular de los canales de potasio maxi K. Estos canales presentan seis segmentos transmembranales (S1-S6), con una región "P" entre los segmentos S5-S6 que forma parte del poro y la región S4 que funciona como el sensor de voltaje semejante a los canales de potasio dependientes de voltaje. Se ha descrito la presencia de un segmento transmembranal adicional (S0) importante en la regulación del canal por la subunidad  $\beta$ . Presenta cuatro segmentos hidrófobos adicionales (S7-S10) importantes para la sensibilidad al calcio. Tomado de Wallner et al., 1996

## Estructura molecular de los canales SK

Los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia o SK están poco caracterizados farmacológicamente y molecularmente en comparación con los canales BK.

Con base en la homología de la región del poro de estos canales, se conocen los siguientes tipos; en el humano el hSK1, y en la rata los rSK1, rSK2 y rSK3 (Köhler et al., 1996). Estos canales comparten un 80-90% de identidad en su secuencia y difieren en los extremos carboxilo y amino terminal. Los índices de hidrofobicidad sugieren que tienen seis segmentos transmembranales similares a los descritos para los canales de potasio dependientes de voltaje (Jan y Jan., 1997). La región S4, que corresponde al sensor de voltaje, posee 3 cargas positivas, así como múltiples sitios consenso de fosforilación y glicosilación.

Con pruebas de hibridación *in situ* e inmunautoradiografías se mostró la localización de estos canales en el cerebro de la rata. Se encontró que los canales rSK1 se encuentra en el giro dentado, en el área CA3 del hipocampo, en el núcleo olfatorio anterior, en el tubérculo olfatorio, en el cerebelo y en la corteza. Los canales rSK2 se encontraron expresados fuertemente en el hipocampo, con poca expresión en el bulbo olfatorio y el núcleo olfatorio anterior, cerebelo, el núcleo reticular, el tálamo y los núcleos pontinos. Los canales rSK3 se encontraron en el área tegmental ventral, en el septum lateral, en el tubérculo olfatorio, en el caudo putamen, el núcleo acumbens, el núcleo supraóptico, y la sustancia negra pars reticulata.

Estos canales tienen diferente sensibilidad a la apamina; un péptido de 18 aminoácidos extraído del veneno de abeja que los bloquea (Hugues 1982; Rudy 1988; Sah 1996). Los canales se expresaron en ovocitos de *Xenopus* y con registros de canal unitario se encontró que los canales rSK2 se bloquean con bajas concentraciones de apamina ( $K_i = 63 \text{ pM}$ ), mientras que los hSK1 son insensibles a la apamina pero se bloquean con altas concentraciones del alcaloide tubocurarina ( $K_i = 76 \text{ } \mu\text{M}$ ).

## El papel fisiológico de los canales de potasio dependientes de calcio

Los canales de  $K(Ca^{2+})$  participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante que sigue a la fase de repolarización del potencial de acción y que lleva al potencial de membrana a valores más negativos que el potencial de reposo.

Los canales BK participan en la repolarización del potencial de acción y en la activación del postpotencial rápido, ya que se ha observado que la adición de 10 nM de caribdotoxina ó 1 mM TEA retardan la repolarización del potencial de acción y disminuyen la amplitud del postpotencial rápido. Además, participan de manera importante en el control de la liberación del neurotransmisor en las terminales sinápticas. Por ejemplo, se ha observado en la unión neuromuscular de la rana que con la adición de caribdotoxina o iberiotoxina aumenta la liberación de neurotransmisor. Si previamente se adiciona DMBAPTA-AM un quelante de alta afinidad para calcio, estas toxinas no muestran efecto alguno. Esto sugiere que estos canales participan en la regulación de la entrada de calcio, ya que los bloqueadores selectivos aumentan la duración del potencial de acción y con esto la entrada de calcio es mayor. Parece que en condiciones normales, estos canales repolarizan rápidamente al potencial de acción limitando la entrada de calcio y por lo tanto la liberación de neurotransmisor (Robitaille y Charlot 1992; Robitaille et al., 1993).

Los canales SK participan en la generación del postpotencial lento (AHP). La duración de este postpotencial es determinada por el tiempo que el calcio está presente en el interior celular. Durante la generación del potencial de acción, la concentración intracelular de calcio aumenta y los canales se activan, el posterior amortiguamiento y secuestro del calcio hacia las pozas intracelulares provoca el cierre de los canales SK y con esto la terminación de la fase lenta del postpotencial hiperpolarizante. Algunos reportes muestran que el postpotencial es generado principalmente por activación de canales de calcio tipo N; es el  $Ca^{2+}$  que entra por estos canales el que activa a los canales SK (Davies et al., 1996; Sah 1996).

El postpotencial regula los intervalos interespiga y en algunos casos participa en el fenómeno de adaptación de la frecuencia neuronal. La corriente que genera estos canales a veces se denomina  $I_{AHP}$ , y es sensible a la apamina (Lancaster y Nicoll, 1987; Gorelova y Reiner 1996).



Existe una  $I_{AHP}$  insensible a la apamina y se le conoce como  $sI_{AHP}$ . La diferencia entre ambos tipos de corrientes es que la corriente sensible a la apamina presenta una activación e inactivación rápida (1-5 ms y 100-200 ms respectivamente), mientras que la corriente insensible tiene activación e inactivación lenta (cientos de milisegundos y 1-2 segundos respectivamente). Esta corriente ya se ha reportado en las células del hipocampo y en el núcleo motor dorsal del vago.

Se sugiere que la corriente lenta se puede producir por algún mecanismo de calcio inducido por calcio, ya que es sensible a la rianodina. Aun se desconocen los detalles de los mecanismos que originan estas corrientes. (Sah 1993; 1996).

Los canales de potasio activados por calcio también participan en la actividad marcapaso de los ganglios del molusco *Aplysia* en donde se encontró que variaciones cíclicas de calcio producidas por las ráfagas de potenciales de acción activan conductancias de potasio dependientes de calcio que repolarizan a la membrana dando lugar a espacios de silencio entre ráfaga y ráfaga (Gorman y Thomas, 1978).

### **La modulación de los canales de potasio activados por calcio**

El postpotencial hiperpolarizante lento (AHP) es blanco de múltiples neuromoduladores, que regulan el patrón temporal de disparo de diferentes tipos neuronales (Brown, 1990, Sah, 1996).

En registros de fijación de corriente de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de rata se observó que la acomodación generada por la aplicación de pulsos despolarizantes de voltaje disminuye cuando se adiciona cadmio y carbacol, por lo que este proceso es regulado por dos tipos de conductancias principalmente, una de potasio dependiente de calcio y una corriente de tipo M (Madison y Nicoll 1984). El postpotencial disminuye con la aplicación de noradrenalina y análogos del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), lo que sugiere que los receptores  $\beta$  adrenérgicos modulan la  $I_{AHP}$  (Madison y Nicoll, 1986; Lancaster y Nicoll 1987).

En registros de fijación de voltaje de neuronas piramidales del hipocampo se encontró que norepinefrina, serotonina, histamina y dopamina activan a la proteína cinasa A (PKA) dependiente

de AMP<sub>c</sub> y en todos los casos disminuye el postpotencial hiperpolarizante (Pedernazi y Storm, 1993, 1995).

El glutamato también disminuye el postpotencial hiperpolarizante a través de receptores metabotrópicos (Sah 1996).

Por otro lado, la activación de la proteína cinasa C (PKC) por la adición de carbacol o esteres de forbol disminuye el postpotencial hiperpolarizante en las neuronas piramidales (Baraban et al., 1985). Efectos similares se han reportado en las neuronas de *Aplysia* (Sawada et al., 1989). Otros trabajos sugieren que la acetilcolina (a través de receptores muscarínicos) actúa a través de la activación de una proteína cinasa II dependiente de calcio-calmodulina (Muller et al., 1992; Pedernazi y Storm, 1996).

Los canales BK que generan el postpotencial hiperpolarizante rápido son modulados por diferentes tipos de proteínas cinasas que controlan los estados de apertura y cierre. En registros unitarios de canales BK del cerebro de rata incorporados a bicapas lipídicas, se encontró que los canales presentan diferencias en la farmacología, conductancia, tiempos de apertura y cierre en respuesta a la fosforilación. Estos canales se clasifican en dos tipos; los canales tipo I fueron sensibles a la CTX, y su probabilidad de apertura así como la sensibilidad al calcio aumentó cuando se adicionó la subunidad catalítica de la PKA, mientras que los canales tipo II fueron insensibles a la CTX y la adición de PKA disminuyó la probabilidad de apertura. Los efectos antagónicos de la proteína cinasa A se revierten con la adición de la subunidad catalítica de la fosfatasa 2A (PP-2A). (Reinhart et al., 1991).

Adicionalmente, la regulación del canal tipo II es más compleja ya que en presencia de adenosin trifosfato (ATP) aumenta la probabilidad de apertura, pero con la adición posterior de PKC la probabilidad de apertura es aun mayor. Sin embargo, cuando se adiciona un inhibidor de la PKC y posteriormente se agrega ATP, no se encuentra efecto lo que sugiere que es un tipo de PKC la que media la acción del ATP. El inhibidor de la cinasa puede revertir los efectos del ATP, lo que indicó la presencia de fosfatasas, probablemente del tipo 1 (PP-1) en la regulación de los canales BK (Chung et al., 1991; Levitan, 1994; Reinhart 1991, 1995).

Estas evidencias sugieren diferentes vías de señalización celular en la regulación de los canales de potasio dependientes de calcio, en la generación del postpotencial hiperpolarizante y por lo tanto en el patrón de disparo neuronal.

## **OBJETIVO**

Debido al efecto de las toxinas específicas, se piensa que los canales de potasio activados por calcio participan de manera importante en la generación del postpotencial hiperpolarizante que regula la frecuencia de disparo de las neuronas neostriatales (Galarraga, 1989; Pineda et al., 1992, 1995). Sin embargo, hasta la fecha no se tienen estudios de las corrientes iónicas que participan en este fenómeno, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar farmacológicamente, por la técnica de fijación de voltaje en célula entera, las corrientes de potasio activadas por calcio presentes en las neuronas neostriatales.

# METODO

## Obtención de las neuronas disociadas

Los experimentos se llevaron a cabo en neuronas neocorticales disociadas obtenidas del cerebro de ratas Wistar macho de 100 a 120 g de peso.

Las ratas se sacrificaron por decapitación después de ser anestesiadas. Se obtenía el cerebro y se colocaba en solución Krebs, que contenía (en mM): 126 de isotianato de sodio, 3.0 KCl, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico, 11 glucosa a pH 7.4.

Posteriormente, se cortaba el tallo cerebral y se separaban los dos hemisferios, pegándolos con acrílico a una caja de Petri que se colocaba en un vibratomo para la obtención de rebanadas sagitales de 400  $\mu$ m de grueso. Estas se incubaban una hora en la solución salina gasificada con una mezcla de 95%O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Para cada disociación se utilizaron 4 rebanadas en las que se disecaba el neocórtex. Estas se incubaban en solución Krebs (32°C) con pronasa E tipo XIV (1 mg/1ml) durante 20 minutos. Posteriormente, se transferían a un tubo de ensayo en donde se realizaba la disociación mecánica con pipetas Pasteur esmeriladas en la punta y con diferentes diámetros. Para esto se utilizó una solución amortiguada con HEPES y bajo calcio, que contiene (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa. Las rebanadas se pasaban cinco veces por cada pipeta, desde el diámetro grueso hasta el fino. El sobrenadante que contenía las neuronas, se colocaba en una caja Petri (Nunc) con cargas negativas en la base) montada en la platina del microscopio invertido. Se esperaba 10 minutos para que las neuronas quedaran fijas a la base de la caja. Posteriormente, se lavaba la disociación con solución salina amortiguada HEPES con calcio, y la preparación se mantenía con una superfusión constante.

La solución HEPES con calcio contiene (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa a pH 7.4 y osmolaridad de 300 mOsm.

### **Registro electrofisiológico**

Los registros se realizaron con la técnica de fijación de voltaje en célula entera.

Se utilizaron microelectrodos de vidrio 3 a 6 M $\Omega$  de resistencia d.c. previamente forjados. Los electrodos contenían la siguiente solución interna (en mM): 115 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.1 leupeptina, 2.0 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>2</sub>GTP (pH= 7.2 con KOH y 270 mOsm/l con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). La solución externa se describió en la sección anterior y contenía 1  $\mu$ M TTX.

La aplicación de las toxinas se llevo a cabo utilizando un sistema de superfusión e intercambio de la solución extracelular.

Se utilizaron las siguientes sustancias: apamina (400 nM), caribdotoxina (10 nM), iberiotoxina (10 nM), tetraetilamonio (10 mM), 4-aminopiridina (3 mM), cadmio (400  $\mu$ M) y bario (3 mM).

### **Adquisición de datos**

Los datos se adquirieron con el programa PCLAMP (CLAMPEX LABMASTER TM100) version 5.5.

Las gráficas se obtuvieron con el programa ORIGIN 4.1 y 3.5

### **Curvas curso-temporal**

Las curvas curso-temporal se obtuvieron del promedio de los trazos de corriente en estado estable generados por el protocolo de voltaje de -80 a 0 mV, regresando a un potencial de -45 mV con duración de 30 ms, a un potencial de mantenimiento de -90 mV. Los gráficos presentan diagramas de caja que representan la distribución y el sesgo de los datos. La línea horizontal que se encuentra dentro de la caja representa la mediana y el punto la media. Las dos líneas verticales que estan fuera de la caja son los errores estándar de la media. El tamaño de la caja representa el percentil 75% de la población.

### **Relación corriente-voltaje**

La relación corriente-voltaje se obtuvo de los trazos de corriente en estado estable generados por pulsos de voltaje de -80 a +60 mV en pasos de 10 mV con una duración de 500 ms a un potencial de mantenimiento de -80 mV (Figura 6).

Las figuras adicionales se obtuvieron por pulsos de voltaje en pasos de 10 mV desde -60 a 40 mV, con una duración de 250 ms a un potencial de mantenimiento de -90 mV.

## RESULTADOS

Los registros de fijación de corriente se realizaron en neuronas neoestriatales bipolares.

Con la aplicación de pulsos de voltaje en pasos de 10 mV, de -60 a +40 y duración de 250 ms, a un potencial de mantenimiento de -90, se observan dos componentes en la corriente saliente, uno persistente que se activa en los primeros pulsos de voltaje y otro transitorio rápido que se activa en los últimos pasos del voltaje (Fig.4)

Cuando el potencial de mantenimiento se cambia a -60 mV, se observa la eliminación de la corriente transitoria, y se evidencia el componente persistente de la corriente saliente.

Los experimentos se realizaron a un potencial de mantenimiento de -90 mV en presencia de 4-AP para eliminar el componente transitorio y obtener solo el componente persistente de la corriente saliente. Sobre este componente se estudio el efecto de los diferentes bloqueadores selectivos de los canales de potasio activados por la entrada de calcio.

### **Efecto del bloqueador 4-aminopiridina sobre la corriente saliente**

La corriente saliente se genera con pulsos de voltaje de -80 a +30 mV, de 30 ms de duración desde un potencial de mantenimiento de -90 mV.

Se observa que con la aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ), la amplitud de la corriente saliente aumenta hasta en un 100% (Fig 5). Sin embargo, si durante la superfusión con  $\text{Cd}^{2+}$  se aplica 4-aminopiridina 4AP (3 mM), y se elimina la corriente transitoria, se observa la disminución en la corriente saliente hasta valores inferiores de los encontrados en el control.

Esto se debe a que el voltaje de activación de la corriente sensible a la 4-AP es similar al voltaje de activación de algunas de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en las células del neoestriado (Bargas et al., 1994). Esto explica el efecto facilitador del  $\text{Cd}^{2+}$  cuando no se encuentra presente la 4-AP. Ambas corrientes se oponen, de tal forma que cuando una se elimina, la otra es más evidente.

Los experimentos subsecuentes se realizaron en presencia de 3 mM de 4-AP.

En la figura 6 se muestran los registros obtenidos cuando se aplicaron pulsos de voltaje en pasos de 10 mV, desde -80 a +60 mV, con una duración de 500 ms desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se observan dos componentes, uno transitorio y otro persistente. Con la adición de 4-AP se reduce el componente transitorio en un  $35.2 \pm 3.8\%$  ( $n=25$ ) como se puede ver en la gráfica de curso temporal generada por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV (Fig. 6F). La relación corriente-voltaje muestra la porción de la corriente sensible a la 4 AP (3 mM).

### **Efecto del cadmio sobre la corriente saliente**

Los registros se realizaron aplicando pasos de voltaje de 10 mV, desde -60 hasta 40 mV con una duración de 250 ms desde un potencial de mantenimiento de -90 mV.

En presencia de 4-AP, la aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ) reduce la corriente saliente persistente en aproximadamente  $53.1 \pm 4.2\%$  ( $n=18$ ), lo que demuestra que alrededor del 50% de esta corriente es activada por la entrada de calcio. La figura 7 muestra la relación corriente-voltajes de la porción sensible a  $\text{Cd}^{2+}$ .

Para probar el efecto de los bloqueadores, se genera corriente con pulsos de voltaje a 0 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. El potencial de regreso fue -45 mV y la duración de los pulsos fue de 30 ms. Se observa que la corriente insensible a 4AP y  $\text{Cd}^{2+}$ , se bloqueo en un  $20 \pm 4.7\%$  ( $n=4$ ) con tetraetilamonio (TEA) a una concentración de 10 mM. La subsecuente adición de  $\text{Ba}^{2+}$  (3 mM) no tuvo efecto adicional (Fig. 7F). Esto demuestra que la corriente saliente persistente en estas neuronas esta compuesta de manera importante por corrientes de potasio activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  así como por las sensibles al voltaje.

### **Efecto de las toxinas caribdotoxina e iberiotoxina sobre los canales de potasio dependientes de calcio tipo BK**

Las diferentes clases de canales de potasio dependientes de calcio son bloqueadas por toxinas selectivas (ver introducción). La caribdotoxina, (CTX 10 nM) péptido extraído del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus* bloquea los canales de potasio dependientes de calcio



del tipo BK, ya que se une a la boca externa del canal e impide la salida de potasio (Rudy, 1988; Latorre 1994; Sah 1996).

La aplicación de esta toxina durante la generación de la corriente saliente por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV y una duración de 30 ms, disminuye un  $34.3 \pm 5.0\%$  ( $n=14$ ) la corriente saliente total. La posterior adición de  $Cd^{2+}$  (400  $\mu M$ ) disminuye la corriente corriente insensible a esta toxina un  $24.2 \pm 4.4\%$  ( $n=5$ ) (Fig. 8F).

Se ha reportado que la CTX también puede bloquear canales de potasio dependientes de voltaje (Miller et al., 1985; Stuhmer et al., 1989), por lo que se decidió utilizar la iberiotoxina (IbTx 10 nM) un péptido más específico para los canales BK extraído del escorpión *Buthus tamulus* (Latorre 1994). Esta toxina disminuye la corriente en un  $29.2 \pm 4.6\%$  ( $n=14$ ) (Fig. 9F). Estos resultados no muestran diferencias significativas con respecto a los obtenidos con la CTX, lo que sugiere que ambas toxinas bloquean de manera similar los canales BK presentes en las células del neocórtex.

#### **La apamina bloquea canales de potasio dependientes de calcio tipo SK**

La apamina, toxina extraída del veneno de abeja, bloquea los canales tipo SK de manera reversible a dosis nanomolar (Blatz y Magleby, 1986; Sah 1996). Mediante la generación de corriente por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV, se encontró que esta toxina produce una reducción de la corriente del  $25.4 \pm 4.6\%$  ( $n=12$ ). Al agregar  $Cd^{2+}$  (400  $\mu M$ ) la corriente se reduce un  $26.8 \pm 2.5\%$  adicional ( $n=3$ ) (Fig. 10).

#### **Efecto aditivo de las toxinas**

La administración de IbTx (10 nM) seguida de apamina (400 nM) reduce cerca de un 35% de la corriente saliente, y cuando se adiciona  $Cd^{2+}$  la disminución llega a un 60% ( $n=4$ ) de la corriente total persistente. Resultados similares se encontraron cuando se invirtió el orden de aplicación de las toxinas (Fig. 11). Siempre hubo efectos aditivos entre IbTx y apamina.

En presencia de CTX (10 nM), apamina (400 nM) y  $Cd^{2+}$  (400  $\mu M$ ) se reduce alrededor del 60% la corriente.

Estos resultados muestran que las toxinas reducen la corriente persistente en un porcentaje similar al que se encontró con el cadmio, y además demuestran que al menos se encuentran dos tipos de canales de potasio dependientes de calcio; los BK y los SK. Se detectaron corrientes insensibles a estas toxinas, pero sensibles a  $\text{Cd}^{2+}$ , es probable que se encuentren canales del tipo IK. Se desconoce el origen del 40% de la corriente persistente restante.

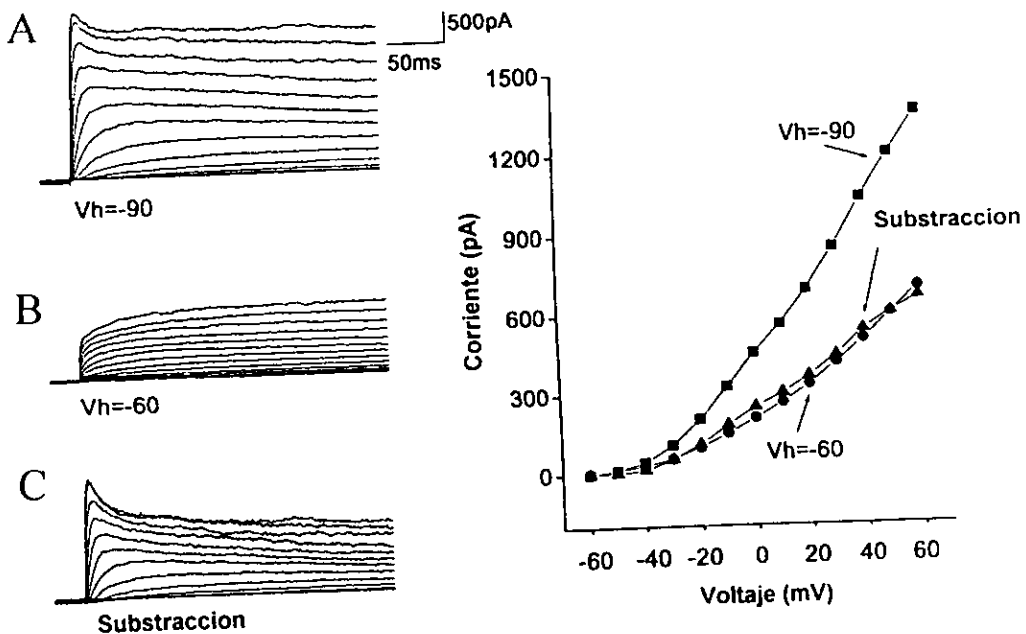


Figura 4: Las corrientes iónicas salientes presentes en las neuronas neocorticales.

Los registros se realizaron con pulsos de voltaje en pasos de 10 mV desde -60 a 40 mV, con una duración de 250 ms a un potencial de mantenimiento de -90 mV. Se observan dos componentes en la corriente saliente, uno persistente y otro transitorio (A). Con los mismos protocolos de voltaje pero a un potencial de mantenimiento de -60 mV, se observa únicamente el componente persistente (B). La substracción de las corrientes obtenidas a ambos potenciales de membrana muestra el componente sensible al cambio de voltaje (C). A la derecha, se muestra la relación corriente-voltaje donde se observa la porción de la corriente sensible al cambio del potencial de mantenimiento.

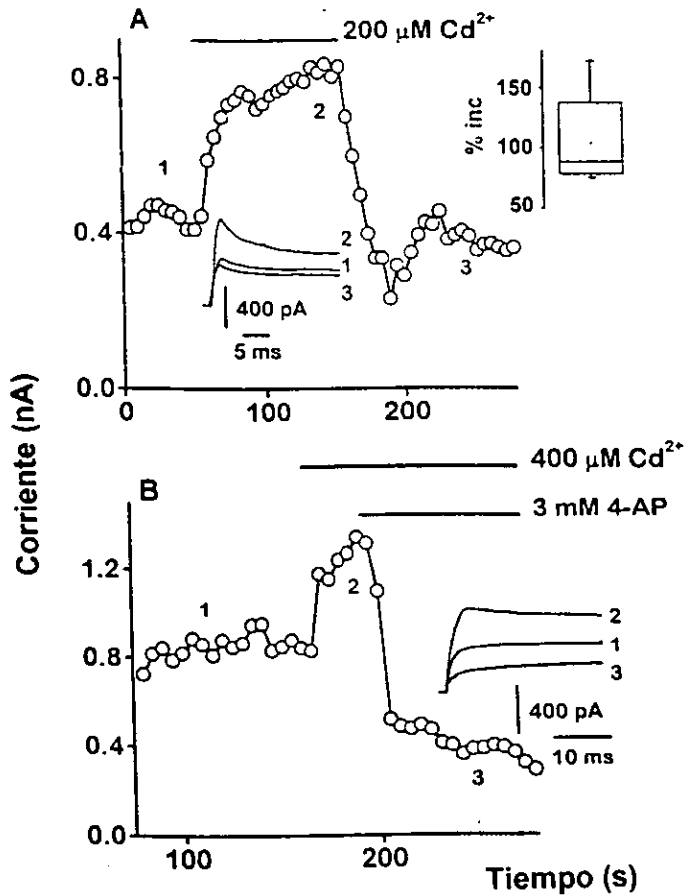


Figura 5: Curso temporal de la corriente saliente durante la aplicación de cadmio y 4-aminopiridina (4 -AP). La corriente saliente se genera con pulsos de voltaje desde -80 hasta +30 mV y duración de 30 ms (parte inferior del curso temporal) (A). Durante la aplicación de Cd<sup>2+</sup> (400 μM), la amplitud de la corriente saliente aumenta hasta en un 100% (diagrama de caja del lado derecho). Por otro lado, la adición de 4-AP (3 mM) después del efecto de cadmio, siempre disminuye la corriente saliente hasta valores menores a los obtenidos en el control (B).

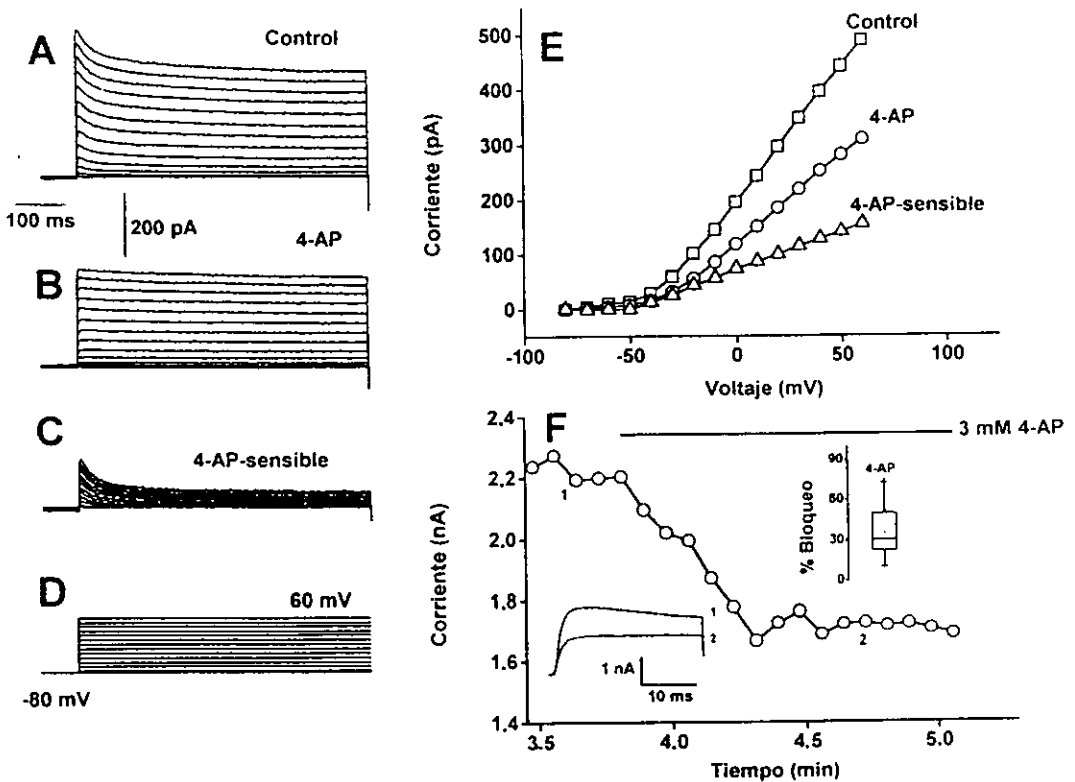


Figura 6: Efecto de la 4-AP sobre la corriente saliente. Los registros se obtienen aplicando pulsos de voltaje de -80 a +60 mV en pasos de 10 mV, con una duración de 500 ms desde un potencial de mantenimiento de -80 mV (D). Se observan dos componentes, uno transitorio y otro persistente (A). Con la adición de 4-AP (3 mM) se elimina la mayor parte del componente transitorio (B). La substracción de los registros A - B muestra la porción sensible a la 4-AP (C). La función corriente-voltaje generada a partir de los registros obtenidos, muestra la corriente sensible a la 4-AP (E). La gráfica de curso-temporal obtenida por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV con un regreso a -45 mV y una duración de 30 ms (parte inferior del curso temporal) muestra la reducción de la corriente por la 4-AP (F). El diagrama de caja en el inserto señala la distribución de los datos (n=25). La línea horizontal que se encuentra dentro de la caja representa la mediana y el punto la media. Las dos líneas verticales que están fuera de la caja son los errores estandar de la media. El tamaño de la caja representa el percentil 75% de los datos. La media  $\pm$  s.e.m de la corriente saliente sensible a la 4- AP fue de  $35.2 \pm 3.8\%$  (n=25).

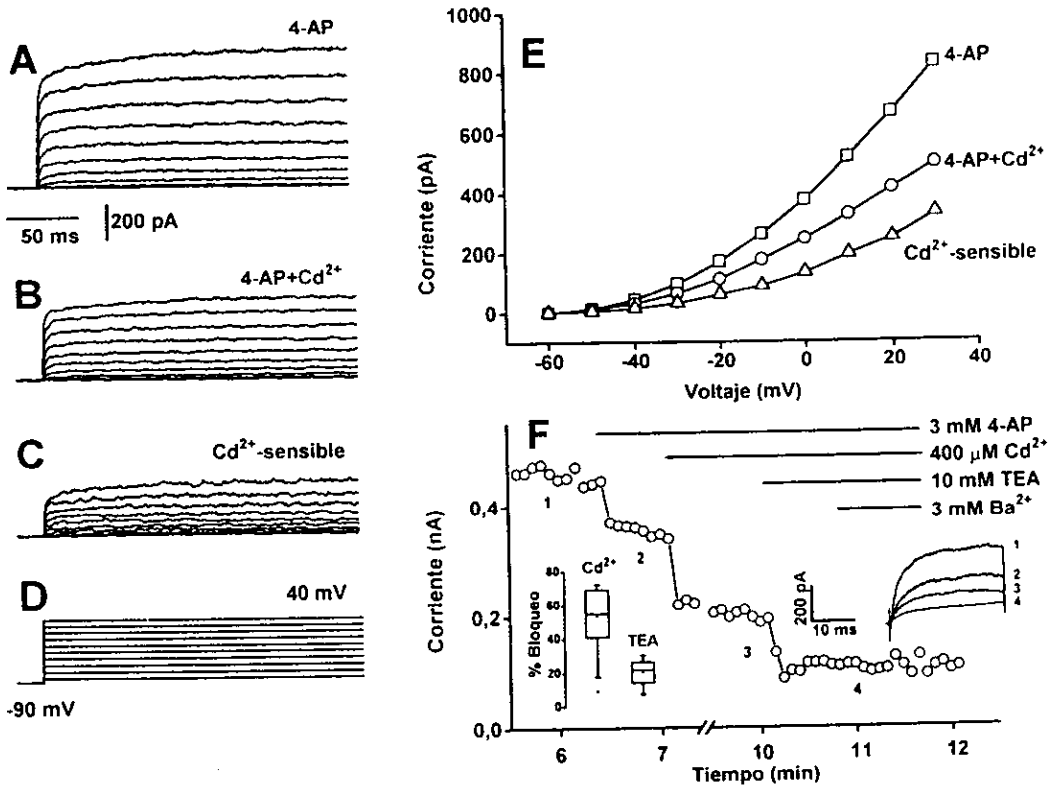


Figura 7: Disminución de la corriente saliente persistente con la aplicación de Cd<sup>2+</sup> (400 μM). Los registros se realizaron en presencia de 4- AP aplicando pulsos de voltaje en pasos de 10 mV desde -60 a 40 mV, con una duración de 250 ms a un potencial de mantenimiento de -90 mV(D). La corriente persistente muestra un componente sensible al Cd<sup>2+</sup> (C). La aplicación de Cd<sup>2+</sup> reduce la corriente saliente persistente en un 53.1 ± 4.2 % (n=18); cuando se administra sobre la corriente generada por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV, y duración de 30 ms (lado derecho del curso temporal). La adición posterior de tetraetilamonio TEA (10 mM) reduce un 20 ± 4.7% (n=4) la corriente restante. El bario no mostró efecto adicional después de administrar todos estos bloqueadores (F).

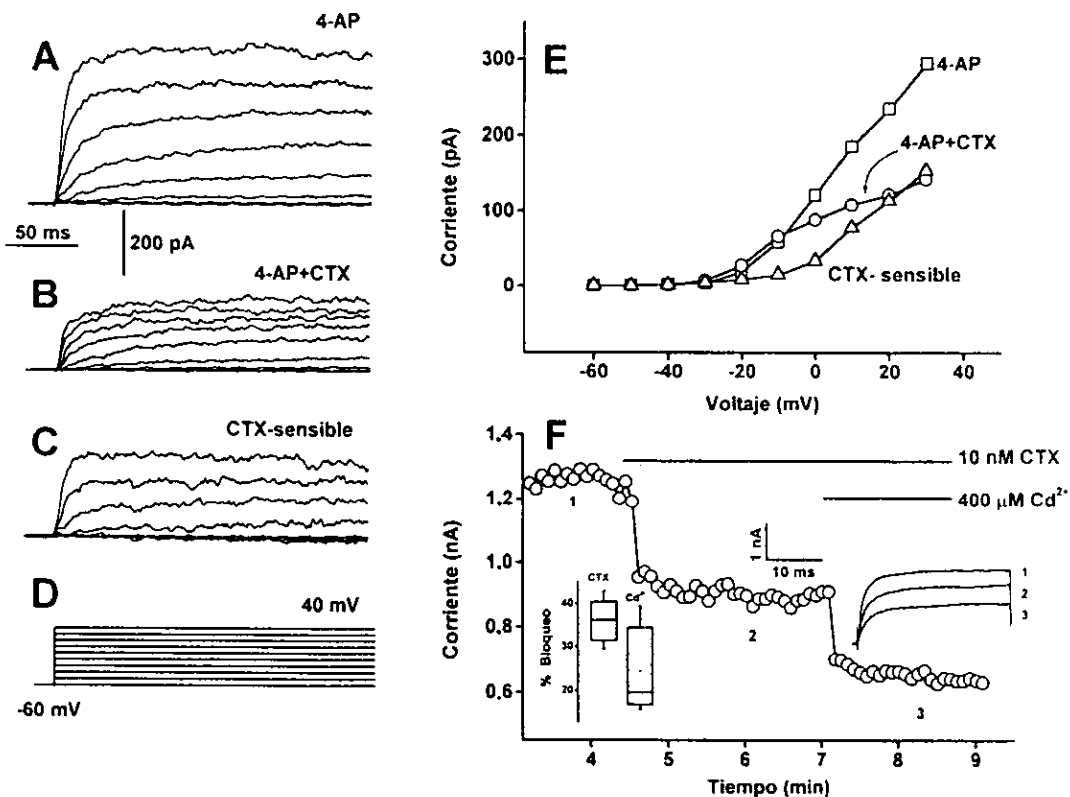


Figura 8: Efecto de la caribdoxina (CTX) a la concentración de 10 nM sobre la corriente saliente persistente en presencia de 4-AP. La corriente saliente se genera por pulsos de voltaje de -60 a 40 mV en pasos de 10 mV y duración de 250 ms, desde un potencial de mantenimiento de -60 mV (D). Se encontró una porción sensible a la CTX (C). Con el protocolo de pulsos de voltaje de -80 a 0 mV, y duración de 30 ms se observa una reducción de la corriente de  $34.3 \pm 5\%$  ( $n=14$ ). Al agregar Cd<sup>2+</sup> después de la CTX la corriente sufrió una disminución adicional del  $24.2 \pm 4.4\%$  ( $n=5$ ) (F).

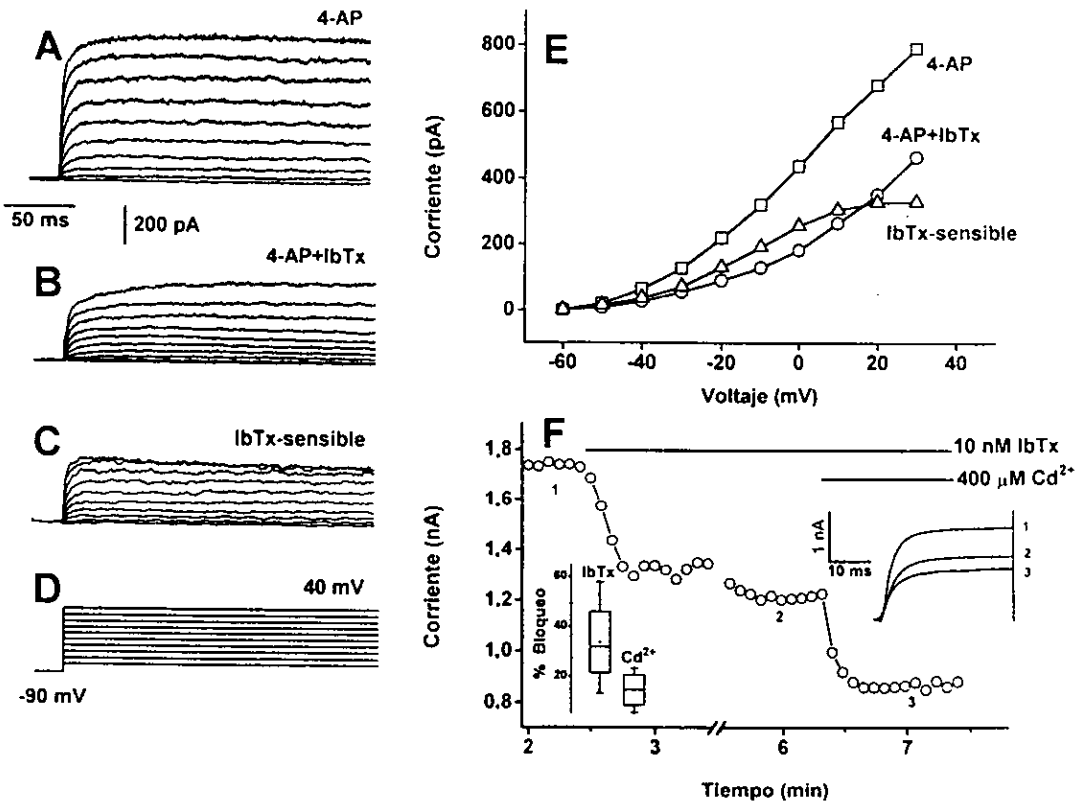


Figura 9: Efecto de la iberiotoxina (IbTx) a concentración de 10 nM sobre la corriente persistente saliente en presencia de 4-AP. Los experimentos se realizaron con pulsos de voltaje de -60 a 40 mV, desde un potencial de mantenimiento de -90 mV (D). La resta de los registros (A-B) muestra la porción sensible a IbTx (C). Usando los pulsos de 30 ms se encuentra una disminución de la corriente del  $29.2 \pm 4.6\%$  ( $n=14$ ) como se muestra en los diagramas de caja (F). La adición de Cd<sup>2+</sup> (400 μM) disminuye un  $14.4 \pm 3.8\%$  ( $n=4$ ) la corriente adicional resistente a este péptido.



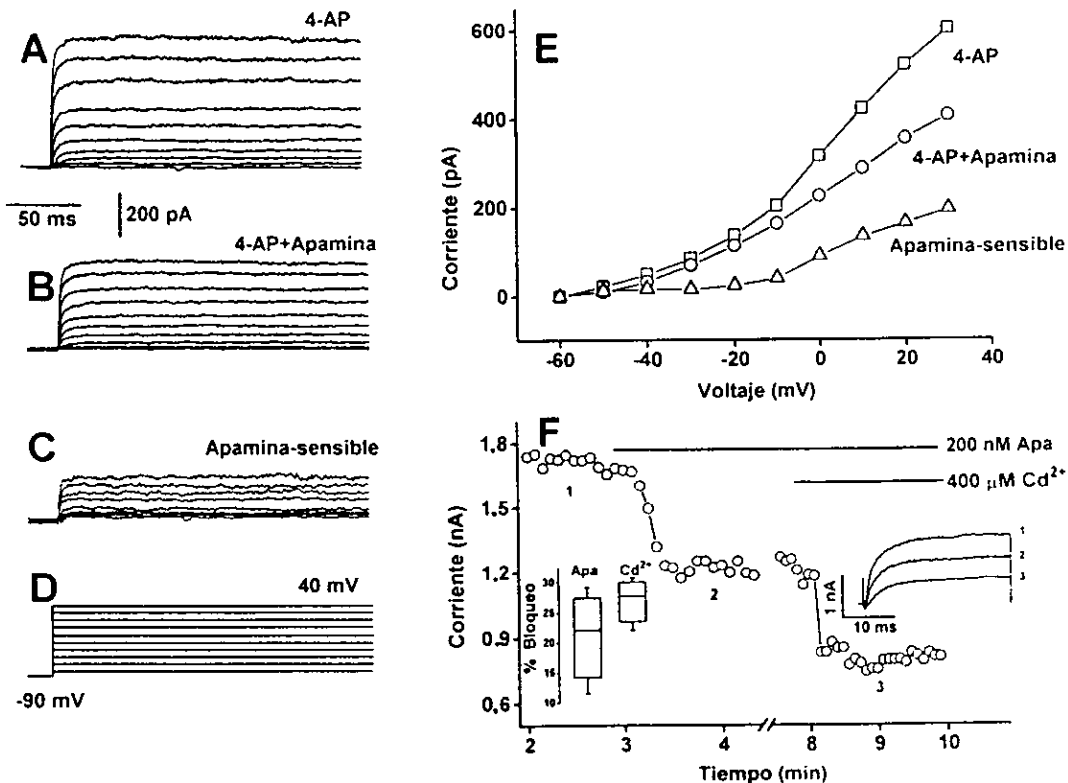


Figura 10. Efecto de la apamina (200 nM) sobre la corriente saliente resistente a la 4- AP. Con pulsos de voltaje de -60 a 40 mV con duración de 200 ms desde un potencial de mantenimiento de -90 mV se genera la corriente saliente (D). La corriente sensible a la apamina se obtiene con la resta de los registros (A-B), cuya curva IV se observa en la figura E. Usando pulsos de 30 ms, la apamina disminuye un  $25.4 \pm 4.6\%$  ( $n=12$ ) la corriente generada por estos. La subsecuente adición de Cd<sup>2+</sup> (400 μM) disminuye un  $26.8 \pm 2.5\%$  adicional ( $n=3$ ); como se observa en los diagramas de caja (F).

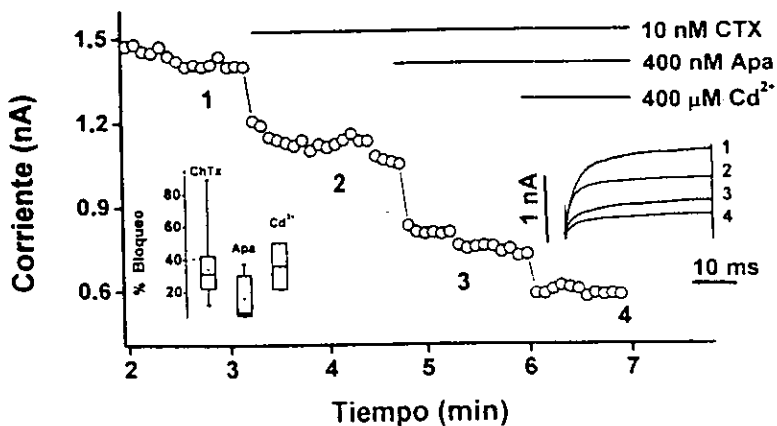
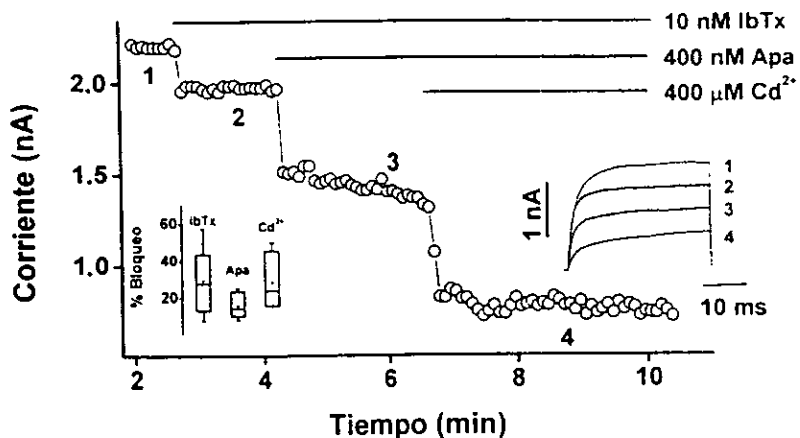


Figura 11. Efecto aditivo de los péptidos.

La adición de IbTx (10 nM) y apamina (400 nM) tienen siempre efectos aditivos reduciendo en 35% la corriente saliente resistente a la 4-AP. La posterior adición de  $\text{Cd}^{2+}$  produce disminución adicional de la porción insensible a ambas toxinas ( $n=4$ ) (A). Resultados similares se encontraron cuando se invirtió el orden de adición de las toxinas en tres experimentos independientes. La adición de CTX (10 nM), y la subsecuente adición de apamina (400 nM), tienen efectos aditivos sobre la corriente. La adición posterior de  $\text{Cd}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ) reduce aun mas la corriente saliente total ( $n=3$ ) (B). Cuando las toxinas se agregan en orden inverso, se obtienen resultados similares.

## DISCUSION

### Papel de la corriente transitoria en las neuronas neoestriatales

Las neuronas neoestriatales de ratas adultas registradas con la técnica de fijación de voltaje presentan dos tipos de corrientes salientes de potasio: una transitoria y otra persistente.

En las neuronas espinosas medianas se han encontrado dos tipos de corriente de potasio transitoria ( $I_A$ ); la lenta ( $I_{A,s}$ ) que se activa a voltajes hiperpolarizados cercanos a  $-65$  mV, se inactiva lentamente y es sensible a la 4-aminopiridina a concentraciones micromolares ( $IC_{50} = 100$   $\mu$ M) y la rápida ( $I_{A,r}$ ) que se activa a potenciales más despolarizados ( $-45$ mV), se inactiva rápidamente y presenta sensibilidad a la 4-aminopiridina a concentraciones milimolares ( $IC_{50} = 2$  mM) (Surmeier et al., 1988, 1991).

La corriente transitoria rápida es virtualmente la única corriente saliente de potasio presente en las neuronas neoestriatales embrionarias (Surmeier et al., 1988; Kitai et al., 1993). En registros realizados en neuronas de rata adulta se observaron además de los componentes transitorios un componente persistente dependiente de voltaje sensible al TEA (Nisenbaum et al., 1996). El componente transitorio se abole totalmente con concentraciones de 0.001-10 mM de 4AP (Nisenbaum et al., 1996).

La 4-AP es un bloqueador de la corriente transitoria  $I_A$  que se activa a voltajes cercanos a  $-50$  mV (Nisenbaum et al., 1996). Este voltaje de activación es semejante al de las corrientes de calcio de alto umbral de estas neuronas, y aun al del potencial de acción (Bargas et al., 1994).

Cuando la corriente transitoria se encuentra presente, la adición de  $Cd^{2+}$  (400  $\mu$ M) bloqueador de la corriente entrante de calcio, aumenta la corriente saliente principalmente la transitoria. Lo que sucede es que al tener ambas corrientes un umbral de activación similar, la eliminación de una de ellas acentúa el efecto de la otra. En este caso, al eliminarse la corriente entrante, la corriente saliente transitoria es más evidente. Sin embargo cuando se adiciona 4-AP (3 mM) el efecto del cadmio sobre las corrientes restantes siempre es disminuir la corriente saliente persistente (Fig.7). Por esta razón, los registros se realizaron en presencia de 4 AP.

En los experimentos realizados en este trabajo, la porción de corriente saliente sensible a 3 mM de 4AP fue  $35 \pm 4\%$  ( $n=25$ ) de la corriente total.

### **Efecto del cadmio y del tetraetilamonio en las corrientes salientes de potasio resistentes a la 4-aminopiridina**

El disparo repetitivo de las neuronas neoestriatales está determinado principalmente por el postpotencial hiperpolarizante lento que sigue al potencial de acción (Galarraga et al., 1989; Pineda et al., 1992, 1995).

En varios tipos neuronales, el AHP es generado principalmente por conductancias de potasio dependientes de calcio ( $KCa^{2+}$ ).

Existen principalmente dos tipos de postpotenciales, uno rápido de duración corta generado por corrientes del tipo BK y el lento que puede durar cientos de milisegundos hasta segundos y es activado por conductancias del tipo SK (Sah, 1996). El postpotencial lento es blanco de varios tipos de neuromoduladores, que regulan de manera importante el patrón y la frecuencia de disparo neuronales (Madison y Nicoll 1986; Pedernazi y Storm 1993, Sah, 1996).

En registros de fijación de corriente realizados en neuronas del neoestriado se observa que con la aplicación de pulsos largos (1seg) se genera un disparo tónico con poca adaptación de la frecuencia de disparo; dependiendo del potencial de membrana (Galarraga et al., 1989; Pineda et al., 1992). La adición de cadmio disminuye la amplitud de el postpotencial lento y aumenta la frecuencia de disparo, lo que sugiere la presencia de canales de potasio dependientes de calcio para su generación. Resultados similares se han encontrado en células de hipocampo (Madison y Nicoll, 1984, Lancaster y Adams 1986, Storm 1990), en neuronas neocorticales (Lorenzon y Foehring, 1992) y en neuronas colinérgicas del septum medial (Gorelova y Reiner, 1996), así como en varios tipos neuronales (revisión Sah 1996).

Se han encontrado resultados similares de bloqueo por cadmio en registros de fijación de corriente de las neuronas CA1 y CA3 del hipocampo del ratón (Brown y Griffith, 1983), en las células de hipocampo de la rata (Klee et al., 1995), del hipocampo del humano (Beck et al., 1997), en las neuronas del bulbo olfatorio de la rata (Wang et al., 1996), así como en las neuronas

simpáticas del ganglio cervical superior de la rata (Galvan y Sedlmeir, 1984) y en las neuronas simpáticas de la rana toro (Lancaster y Pennefather 1987).

En los registros de fijación de voltaje realizados en las células del neocórtex se encontró que el  $53.1 \pm 4.2\%$  ( $n=18$ ) de la corriente saliente persistente es sensible a la adición de  $\text{Cd}^{2+}$   $400 \mu\text{M}$ , lo que sugiere la presencia de corrientes de potasio activadas por calcio (Fig. 7C, E).

La adición de TEA (10 mM) después del  $\text{Cd}^{2+}$  disminuye un  $20 \pm 4.7\%$  ( $n=4$ ) adicional la porción de corriente insensible a la 4-AP y el  $\text{Cd}^{2+}$ . Esto indica que parte de la corriente saliente persistente es generada por la corriente dependiente de voltaje y no de  $\text{Ca}^{2+}$ . La adición de bario (3 mM), no muestra efecto adicional después de los bloqueadores mencionados anteriormente.

La corriente persistente dependiente de voltaje ya ha sido caracterizada (Nisenbaum et al., 1996). Esta corriente presenta una constante de tiempo de activación de 50 ms a voltajes hiperpolarizados cercanos a  $-70 \text{ mV}$ . La constante de tiempo alcanza valores de 100 ms a voltajes cercanos a  $-45 \text{ mV}$  y se inactiva lentamente en 1-8 segundos. En registros *in vitro* de fijación de corriente de las neuronas neocórtices se observó la generación de un transitorio de voltaje con la aplicación de pulsos despolarizantes subumbrales, previa aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$ , TTX y 4 AP (Nisenbaum et al, 1994, 1995). Este fue sensible al TEA 25 mM (Nisenbaum y Wilson, 1995). Estos resultados sugieren la participación de esta corriente persistente en la rectificación saliente. Además las características de activación e inactivación lenta de la corriente corresponden con la generación del transitorio de voltaje observado en los registros intracelulares (Nisenbaum y Wilson, 1995).

La porción de corriente saliente insensible a los bloqueadores mencionados anteriormente, puede explicarse por un bloqueo incompleto de las corrientes de potasio dependientes de voltaje, ya que con concentraciones mayores de TEA y 4 AP se obtienen porcentajes de bloqueo mayores (Nisenbaum et al., 1996). Otra alternativa es que se trate de corrientes salientes de cloro que no se identificaron, ya que resultados preliminares muestran que parte de la corriente insensible a 4AP,  $\text{Cd}^{2+}$ , TEA y  $\text{Ba}^{2+}$  disminuye con la adición de NPPB (ácido benzoico 5-nitro-2-3-fenilpropilamino), bloqueador de canales de cloro.

## **Tipos de canales de potasio activados por calcio presentes en las neuronas neostriatales y su papel fisiológico**

### **Canales de potasio de alta conductancia (BK)**

Los canales BK presentan una distribución ubicua (Latorre et al., 1989). En varios tipos neuronales, y en el músculo liso estos canales participan en la repolarización del potencial de acción y en la generación del postpotencial hiperpolarizante rápido (Latorre et al., 1989; Sah et al., 1996).

La caribdotoxina (CTX) es un bloqueador selectivo de canales de potasio tipo BK (Gimenez-Gallego et al., 1988; Latorre 1989).

En los registros de fijación de corriente realizados en las neuronas neostriatales, se observa que la aplicación de CTX (9-18 mM), retarda la repolarización del potencial de acción y disminuye el postpotencial lento generado en los primeros potenciales de acción durante un tren de espigas, sin modificar la frecuencia de disparo. Resultados similares se encontraron con la aplicación de tetraetilamonio 0.5 mM, ya que concentraciones menores a 1 mM también bloquean los canales BK selectivamente (Pineda et al., 1992). La CTX disminuye la corriente saliente generada por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV en un  $34.3 \pm 5.0\%$  (n=14), lo que indica la presencia de canales de potasio tipo BK en estas neuronas (Fig. 8).

Los resultados obtenidos sugieren que estos canales de potasio de alta conductancia se encuentran presentes en las neuronas neostriatales. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la caribdotoxina no es específica para los canales tipo BK, ya que también bloquea canales de potasio dependientes de voltaje (Schweitz et al., 1989; Hille 1992). Además, su efecto depende de las concentraciones iónicas presentes en el medio, ya que el aumento en iones  $K^+$  o  $Na^+$  disminuye la afinidad de la toxina por los canales (Latorre 1994).

Por esta razón se utilizó iberiotoxina (IbTx), un bloqueador mucho más selectivo de los canales BK, que presenta una  $K_d$  menor que el de la CTX y cuyo efecto no depende de las condiciones iónicas presentes (Latorre 1994).

Con IbTx, se encontró una disminución de la corriente del  $29.2 \pm 4.6\%$  (n=14). No se encontraron diferencias significativas con los porcentajes de bloqueo de la CTX. Lo que sugiere

que ambas toxinas bloquean de manera equivalente a los canales BK en las neuronas espinosas medianas.

Porcentajes de bloqueo similares de corrientes de potasio activadas por calcio del tipo BK se han reportado en las neuronas del bulbo olfatorio; donde se observó que con previa aplicación de TEA (20 mM), la IbTx no muestra efecto alguno (Wang et al., 1996). También en las neuronas de la región CA1 y CA3 del hipocampo (Klee et al., 1995), en las neuronas del bulbo olfatorio de la rata (Egan et al., 1993), y en los ovocitos de *Xenopus* donde se expresaron canales derivados del gen mSlo que codifica canales de potasio activados por calcio de alta conductancia del cerebro y el músculo del ratón (Butler et al., 1993).

En registros de fijación de corriente de neuronas CA1 del hipocampo se observó la disminución del pospotencial rápido y un aumento en la frecuencia de disparo en los potenciales de acción iniciales, así como un retardo en la repolarización del potencial de acción (Lancaster y Nicoll, 1987). Lo mismo se encontró en las interneuronas inhibitorias de esta región del hipocampo (Zhang y McBain, 1995) y en otros tipos celulares (revisiones Latorre 1989; Sah 1996).

Estudios de hibridación *in situ* y de anticuerpos monoclonales contra la proteína Slo demostraron que el RNAm y la proteína se encuentran presentes en el soma de las neuronas neocorticales. Los canales BK se encuentran abundantemente en las terminales presinápticas de las neuronas estriatales de proyección (Knaus et al., 1996). No obstante, aún no existen estudios sobre el papel de estos canales en la liberación de neurotransmisor.

### **Canales de potasio de baja conductancia (SK)**

Los canales de potasio de baja conductancia también presentan una distribución ubicua. La corriente que genera se le conoce como  $I_{AHP}$ . Estos canales participan en el intervalo interespiga y en la generación del postpotencial hiperpolarizante lento (AHP) que da lugar al patrón y frecuencia de disparo neuronales (Latorre et al., 1989). Generan parte de la adaptación de la frecuencia de disparo las neuronas piramidales del hipocampo (Madison y Nicoll, 1984).

En los registros de fijación de corriente, se observa que el postpotencial lento presenta una mayor amplitud cuando sigue a varios potenciales de acción y no a uno solo. Esto indica que

estos canales necesitan para su activación la entrada de calcio por canales de calcio dependientes de voltaje. Su actividad perdura hasta que los procesos de amortiguamiento del calcio eliminan a este catión, provocando el cierre de los canales.

Los canales SK son bloqueados por concentraciones nanomolares de apamina, un péptido extraído del veneno de abeja con una  $IC_{50} = 1.3 \text{ nM}$  (Blatz y Magleby, 1986; Hugues et al., 1982, Bourque y Brown, 1987).

En las neuronas del neocórtex se observa un pospotencial lento con duración de 250 ms. La aplicación de apamina (0.1-1  $\mu\text{M}$ ) disminuye la amplitud del pospotencial lento en un 50% aumentando la frecuencia de disparo sin tener efecto alguno sobre la repolarización del potencial de acción (Pineda et al., 1992).

En los registros de fijación de voltaje de las neuronas neocorticales disociadas se observa que la apamina disminuye en un  $27.8 \pm 6\%$  ( $n=12$ ) la corriente saliente persistente generada por pulsos de voltaje de -80 a 0 mV y con duración de 30 ms. Estos datos sugieren la presencia de canales SK las neuronas neocorticales (Sah y Bekkers, 1996).

En estudios recientes de biología molecular, se han clonado canales de potasio dependientes de calcio del cerebro de humano y de rata. Por estudios de hibridación *in situ* se encontró que en el neocórtex de la rata se encuentra presente el canal rsk3 (Kohler et al., 1996).

En registros de fijación de voltaje de célula entera de las neuronas del bulbo olfatorio, se reportaron valores de inhibición similares (Wang et al., 1996), así como en las células receptoras del gusto (Chen et al., 1996). En registros de fijación de voltaje en célula entera de neuronas ciliadas de tortuga se observó que la aplicación de 100 nM de apamina bloquea por completo las colas de corriente de potasio, sin afectar las corrientes de calcio (Tucker y Fettilplace, 1996). De manera similar esto se observó en células cromafines de la rata en cultivo primario (Park 1994).

La mayoría de los registros de canales de potasio dependientes de calcio que generan el pospotencial lento se han realizado con la técnica del protocolo híbrido en donde los registros de fijación de corriente se cambian a fijación de voltaje, de manera que al final del pulso de corriente que se aplica para generar un tren de espigas, se cambia a la modalidad de fijación de voltaje, observándose cola de corriente que refleja el cierre de los canales. Estas colas de corriente son sensibles a la concentración externa de potasio y se eliminan con  $\text{Cd}^{2+}$  (Cassell y McLachlan, 1987; Constanti y Sim, 1987; Lancaster y Adams 1986; Lancaster y Pennefather, 1987). Las colas



de corriente se bloquean con apamina en las neuronas ganglionares de la rana (Pennefather et al., 1985) y de la rata ( Davies et al., 1996), en la corteza sensoriomotora del gato (Schwindt et al., 1992), en las neuronas neurosecretoras de la rata (Kirkpatrick y Bourque, 1996), así como por distintos tipos de neuromoduladores como la norepinefrina, histamina, serotonina y dopamina en las neuronas CA1 del hipocampo (Pedernazi y Storm, 1993; 1995).

En registros de fijación de corriente de las interneuronas de la región CA1 del hipocampo de la rata, la aplicación de apamina disminuyó el postpotencial lento y aumentó la frecuencia de disparo (Zhang y McBain, 1995), en las neuronas neurosecretoras magnocelulares de la rata se observa un disparo fásico, con periodos de silencio seguidos de ráfagas de potenciales de acción. La aplicación de apamina aumenta el espacio interráfaga, lo que sugirió que los canales SK participan en este fenómeno (Kirkpatrick y Bourque, 1996). En las neuronas neocorticales de la rata, donde se han caracterizado tres tipos de postpotenciales hiperpolarizantes (rápido, medio y lento), la apamina abole el postpotencial medio y aumenta la frecuencia durante el disparo repetitivo (Lorenzon y Foehring, 1992). De manera similar esto se encontró en las motoneuronas del núcleo dorsal motor del vago (Sah y McLachlan, 1992).

En las neuronas del hipocampo, del núcleo dorsal motor del vago y en neuronas corticales se ha encontrado una corriente de potasio activada por calcio insensible al TEA y a la apamina, con una conductancia de 19 pS y con una cinética de activación e inactivación lenta, a la cual se le conoce como corriente sIAHP. Esta corriente participa en la generación del postpotencial hiperpolarizante, en la adaptación neuronal y es modulada por múltiples neurotransmisores. Sin embargo, aun no ha sido caracterizada en su totalidad y se desconoce su relación con los canales de potasio SK (Sah, 1993, 1996).

### **Efecto aditivo de los bloqueadores de canales de potasio dependientes de calcio**

La adición consecutiva de IbTx y/o caribdotoxina mas apamina producen efectos aditivos. La corriente persistente saliente llega a bloquearse hasta en un 60%, (Fig. 11). Lo mismo sucedió cuando se invirtió el orden de las toxinas; además la posterior adición de  $\text{Cd}^{2+}$  disminuye una fracción adicional de la corriente insensible a ambas toxinas.

Estos resultados sugieren que las toxinas son específicas para los canales BK y SK, ya que el orden de adición de las mismas no afecta el porcentaje de bloqueo de la corriente saliente. Este porcentaje fue mayor al observado con el  $\text{Cd}^{2+}$ , posiblemente porque el efecto de este catión es a través de la disminución las corrientes entrantes de calcio. Por lo tanto, el uso de las toxinas específicas para los canales activados por calcio proporciona mayor información de la proporción de canales BK y SK presentes en las células neocorticales. El bloqueo adicional por el  $\text{Cd}^{2+}$ , después de la aplicación de ambas toxinas, sugiere la presencia de canales de potasio dependientes de calcio insensibles a los bloqueadores de canales de potasio BK y SK. Se les conoce como canales de conductancia intermedia (IK) y presentan conductancias entre 30 y 70 pS. Se desconoce su papel funcional (Sah, 1996).

Los registros en los que previamente se adicionó  $\text{Cd}^{2+}$  nunca mostraron un efecto posterior de la apamina o la IbTx (no se muestran), lo que demuestra que la entrada de calcio por canales sensibles al voltaje activa a los canales de potasio. Además, las mediciones de calcio presentes en la solución interna mostraron valores de alrededor de 150 nM, valores cercanos a la concentración intracelular en condiciones de reposo (Lodish et al., 1995) lo que indica que no existe contaminación por calcio y este necesariamente proviene del medio extracelular.

En la activación de canales de potasio dependientes de calcio también participa el calcio de las pozas intracelulares. Se ha observado que la aplicación de cafeína aumenta la amplitud y duración del postpotencial hiperpolarizante, este efecto es revertido por la procaina (Morita y Barret, 1990). De manera similar esto se ha observado en las neuronas de los ganglios simpáticos de la rana (Kuba et al., 1983), así como la disminución de la corriente insensible a la apamina, por la rianodina en las neuronas simpáticas de los ganglios cervicales de la rata (Davies et al., 1996).

Estos estudios no se han realizado en el neocórtex, por lo que no se descarta la posibilidad de que calcio de las pozas intracelulares también active a estos canales.

## CONCLUSIONES

- 1.- Los registros realizados con la técnica de fijación de voltaje modalidad célula entera de las neuronas neocorticales, demostraron la presencia de canales de potasio activados por calcio, como un importante componente de la corriente saliente persistente (50%).
- 2.- La apamina, bloqueador selectivo de los canales tipo SK redujo  $25 \pm 4.6\%$  la corriente saliente.
- 3.- La CTX y la IbTx , bloqueadores de los canales BK, reducen un  $34.3 \pm 5\%$  y  $29.2 \pm 4\%$  la corriente saliente. No se encontraron diferencias significativas entre ambas toxinas.
- 4.- Hubo efectos aditivos con la adición consecutiva de caribdotoxina ó iberitoxina mas apamina.
- 5.- Estos resultados demostraron la presencia de canales de potasio dependientes de calcio del tipo BK y SK en las neuronas neocorticales, así como la posible presencia de canales IK, ya que se observó efecto adicional del  $\text{Cd}^{2+}$  después de la adición CTX/IbTx mas apamina.
- 6.- Se confirma que el componente dependiente de voltaje de la corriente saliente son transitorios y persistentes de inactivación lenta, sensibles a el 4-AP y TEA respectivamente.
- 7.- Existe un componente persistente de la corriente que no se bloqueo con ninguna de las sustancias utilizadas. La identidad de esta corriente remanente es desconocida.

## BIBLIOGRAFIA

- \* Anderson C, MacKinnon R, Smith C and Miller C (1988). Charybdotoxin block of single  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  channels. Effects of channel gating, voltage and ionic strength. *J. Gen. Physiol.* 91: 317-333.
- \*Aquilonius SM and Sjoström R (1971). Cholinergic and dopaminergic mechanism in Huntington's chorea. *Life Sci.* 10: 405-414.
- \*Atkinson NS, Robertson GA and Ganetzky B (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* 253: 551-554.
- \*Baraban JM, Snyder SH and Alger BE (1985). Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: electrophysiological effects of phorbol esters. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 82: 2538-2542
- \*Bargas J, Galarraga E, and Aceves J (1989). An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp. Brain. Res.* 75: 146-156.
- \*Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y and Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of  $Ca^{2+}$  currents in acutely isolated adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14: 6667-6686
- \*Barrett EF and Barrett JN (1976). Separation of two voltage-sensitive potassium currents, and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurons. *J. Physiol. Lond.* 255: 737-774
- \*Barrett JN, Magleby KL and Pallota BS (1982). Properties of single calcium activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. Lond.* 331: 211-230
- \*Beck H, Clusmann H, Kral T, Schramm J, Heinemann U, Elger CE (1997). Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J. Physiol.* 498(1): 73-85.
- \*Benham CD, Bolton TB, Lang RJ and Takewaki T (1986). Calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells of rabbit jejunum and guinea-pig mesenteric artery. *J.Physiol. Lond.* 371: 45-67.
- \*Bielefeldt K and Jackson MB (1993). A calcium activated potassium channel causes frequency-dependent action potential failures in a mammalian nerve terminal. *J. Neurophysiol* 70: 284-298.
- \*Blatz AL and Magleby KL (1984). Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Gen Physiol.* 84: 1-23.
- \*Blatz AL and Magleby KL (1986). Single apamin-blocked  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature.* 323: 718-720
- \*Blatz AL and Magleby KL (1987). Calcium activated potassium channels. *TINS* 10: 463-467.
- \*Bontems F, Roumestand C, Gilquin B, Menez A and Toma F (1991). Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science.* 254: 1521-1523.
- \*Bontems F, Gilquin B, Roumestand C Menez A and Toma F (1992). Analysis of side-chain organization in a refined model of charybdotoxin: structure and functional implications. *Biochemistry* 31: 7756-7764.
- \*Bourque, CW and Brown DA (1987). Apamin and d-tubocurarine block the afterhyperpolarization of rat supraoptic neurosecretory neurons. *Neuroscience Letters.* 82: 185-190.
- Brown DA and Griffith WH (1983). Calcium activated outward current in voltage-clamped hippocampal neurones of the guinea-pig. *J. Physiol* 337: 287-301

- \*Brown DA (1990). G-proteins and potassium currents in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 215-242.
- \*Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "Maxi" calcium activated potassium channel. *Science* 261: 221-224
- \*Calne DB (1980). Therapeutics in neurology. London. Blackwells.
- \*Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani L and Maelicke A (1982). Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature (Lond)*. 296: 90-91
- \*Casell JF and McLachlan EM (1987). Two-calcium activated potassium conductances in a subpopulation of coeliac neurones of guinea-pig and rabbit. *J. Physiol.* 394: 331-349.
- \*Chang HT, Wilson CJ and Kitai ST (1982). A Golgi study of neostriatal neurons: light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 208: 107-126.
- \*Chen Y, Sun XD and Herness S (1996). Characteristics of action potentials and their underlying outward currents in rat taste receptor cells. *J. Neurophysiol.* 75 (2): 820-830
- \*Chung SK, Reinhart PH, Martin BL, Brautigam D and Levitan IB (1991). Protein kinase activity closely associated with a reconstituted calcium-activated potassium channel. *Science* 253: 560-562.
- \*Constanti A and Sim JA (1987). Calcium-dependent potassium conductance in guinea-pig olfactory cortex neurones in vitro. *J. Physiol.* 387: 173-194.
- \*Crest M, Jacquet J, Gola M, Zerrouk H, Benslimane A, Rochat H, Mansuele P and Martin-Eauclaire M (1992). Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J. Biol. Chem.* 267: 1640-1646.
- \*Davies PJ, Ireland DR and McLachlan E (1996). Sources of Ca<sup>2+</sup> for different Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> conductances in neurones of the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol.* 495(2): 353-366
- \*Durell SR and Guy HR (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J.* 62: 238-247.
- \*Egan TM, Dagan D and Levitan IB (1993). Properties and modulation of a calcium-activated potassium channel in rat olfactory bulb neurons. *J. Neurophysiol.* 69(5): 1433-1441
- \*Franciolini F (1988). Calcium and voltage dependence of single Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels from cultured hippocampal neurons of rat. *Biochim. Biophys. Acta* 943: 419-427.
- \*Galarraga E, Bargas J, Sierra A and Aceves J (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain. Res.* 75: 157-168.
- \*Galvan M and Sedlmeir C (1984). Outward currents in voltage-clamped rat sympathetic neurones. *J. Physiol.* 356: 115-133.
- \*Garcia-Calvo N, Knaus HG, McManus OB, Giangiacoimo KM, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1994). Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from trachea smooth muscle. *J Biol Chem.* 269: 676-682.
- \*Giangiacoimo K, Garcia M and McManus (1992). Mechanism of iberiotoxin block of the large conductance calcium activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 31: 6719-6727.
- \*Gimenez-Gallego B, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ and Garcia ML (1988). Purification, synthesis, and model structures of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 3329-3333
- \*Gorelova N and Reiner P (1996). Role of afterhyperpolarization in control of discharge properties of septal cholinergic neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 75(2): 695-706.

- \*Gorman ALF and Thomas MV (1978). Changes in the intracellular concentration of free calcium ions in a pace-maker neurone, measured with the metallochromic indicator dye arzenato III. *J. Physiol Lond.* 275: 357-376.
- \*Hernandez -López S, Bargas J, Reyes A, Galarraga E (1996). Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *Neuroreport* 7: 454-456.
- \*Hille B (1992). Potassium channels and chloride channels. En: *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd. ed.(Ed: Sinauer Associates Inc.) Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 115-139.
- \*Hinrichsen RD (1993). Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> channels: distribution and function. En: *Calcium-dependent potassium channels*. 1st ed (Ed. Constance Kerkaporta) RG. Landes Company. Austin. 16-31
- \*Hodgkin AL and Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. Lond.* 117: 500-544.
- \*Howe AR and Surmeier DJ (1995). Muscarinic receptors modulate N- P and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J. Neurosci.* 15: 458-469
- \*Hugues M, Romey G, Duval D, Vincent JP and Lazdunski M (1982). Apamin as a selective blocker of the calcium dependent potassium channels in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc. Natl.Acad.Sci.* 79: 1308-1312.
- \*Johnston D and Sin Wu SM (1995). Functional diversity of voltage-gated conductances En: *Foundations of Cellular Neurophysiology* (Ed. MIT Press). Cambridge, Massachusetts. London, England. 183-214.
- \*Jan LY and Jan YN (1992). Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. *Annu.Rev. Physiol.* 54:537-555
- \*Jan LY and Jan YN (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu.Rev. Neurosci.* 20: 91-123.
- \*Kemp JM and Powell T (1971a). The site of termination of afferent fibers in the caudate nucleus. *Phil. Trans. Soc. Lond.* 262: 413-427.
- \*Kemp JM and Powell T (1971b). The synaptic organization of the caudate nucleus. *Phil. Trans. Soc. Lond.* 262: 403-412
- \*Kirkpatrick K and Bourque CW (1996). Activity dependence and functional role of the apamin-sensitive K<sup>+</sup> current in rat supraoptic neurones in vitro. *J. Physiol.* 494(2): 389-398.
- \*Kita H, Kita T and Kitai ST (1985). Active membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Exp. Brain. Res*60: 54-62.
- \*Kitai ST and Surmeier DJ (1993). Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons En: *Advances in Neurology* ( Ed: H. Narabayashi, T. Nagatsu, N. Yanagisawa and Y. Mizuno). Raven Press Ltd., New York. pp: 40-52.
- \*Klee R, Ficker E and Heinemann U (1995). Comparasion of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J. Neurophysiol.* 74(5): 1982- 1995.
- \*Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LMH, Sanchez M, Giangiacoimo K, Reuben JP, Smith AB and Kaczorowski GJ (1994). Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channel. *Biochemistry* 33: 5819-5828.
- \*Kohler M, Hirschberg, B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie Jand Adelman JP (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273: 1709-1714.

- \*Knaus HG, Garcia-Calvo N, Kaczorowski GJ and Garcia ML (1994). Subunit composition of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *J Biol Chem* 269: 3921-3924.
- \*Knaus HG, Schwarzer Christoph, Koch ROA, Eberhart A, Kaczorowsky GJ, Glossmann H, Wunder F, Pongs O, Garcia ML and Sperk G (1996). Distribution of High-conductance  $Ca^{2+}$ -activated- $K^{+}$  channels in rat brain: Targeting to axons and nerve terminals. *J. Neurosci* 16: 955-963.
- \*Kuba K, Morita K and Nohmi M (1983). Origin of calcium ions involved in the generation of slow afterhyperpolarization in bullfrog sympathetic neurones. *Pflügers Arch.* 399: 194-202.
- \*Lancaster B and Nicoll RA(1987). Properties of two-calcium activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J. Physiol* 389: 187-203.
- \*Lancaster B and Adams (1986). Calcium dependent current generating the afterhyperpolarization in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 55(6): 1268-1282.
- \*Lancaster B and Pennefather P (1987). Potassium currents evoked by brief depolarizations in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.* 387: 519-548.
- \*Latorre R, Oberhauser A, Labarca P and Alvarez O (1989). Varieties of calcium activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* 51: 385-399.
- \*Latorre R (1994). Molecular workings of large conductance (Maxi)  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels. En: *Handbook of membrane channels* (Ec. C. Peracchia). Academic Press NY. 79-102.
- \*Levitan IB (1994). Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu Rev Physiol.* 56: 193-212.
- \*Lingle CJ, Solaro CR, Prakriya M and Ding JP (1996). Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. En: *Ion channels.* (4) (Ed. Toshio Narahashi) Plenum Press. New York and London USA. 261-301
- \*Lodish Harvey, Baltimore D, Berk A, Lawrence S, Matsudaira P and Darnell James (1995). Transport across cell membranes. En: *Molecular Cell Biology.* (Ed. Scientific American Books). American Books U.S.A. 640-641.
- \*Lorenzon NM and Foehring (1992). Relationship between repetitive firing and afterhyperpolarizations in human neocortical neurons. *J. Physiol.* 67(2): 350-363.
- \*MacKinnon R and Miller C. (1988). Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance calcium activated potassium channel. *J Gen Physiol* 91: 335-349.
- \*MacKinnon R (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature (Lond).* 350: 232-235.
- \*Madison DV and Nicoll RA (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurones in vitro. *J. Physiol (London)* 354: 319-331
- \*Madison, DV and Nicoll RA (1986). Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, *in vitro.* *J. Physiol.* 372: 221-244.
- \*Marty A and Neher E (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Physiol (Lond)* 367: 117-141
- \*McCormick DA (1998). Membrane properties and neurotransmitter actions. En: *The Synaptic Organization of the Brain* 4a ed. (Ed: Sheperd GM). Oxford UP., New York. pp: 37-75.
- \*McManus OB (1991). Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J. Bioenerg. Biomembr* 23: 537-560
- \*McManus OB, Pallanck L, Helms LMH, Swanson R and Leonard RJ (1995). Functional role of the  $\beta$  subunit of high conductance  $Ca^{2+}$ - activated  $K^{+}$  channels. *Neuron* 14: 645-650.

- \*Meech RW and Strumwasser F (1970). Intracellular calcium injection activates potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Fed.Proc.* 29: 834.
- \*Miller C, Moczydlowski E, Latorre R and Phillips M (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* 313:316-318
- \*Morita K and Barret E (1990). Evidence for two-calcium dependent potassium conductances in lizard motor nerve terminals. *J.Neurosc.* 10(8): 2614-2625.
- \*Muller W, Petrozzino JJ, Griffith LC, Danho W and Connor JA (1992). Specific involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin kinase II in cholinergic modulation of neuronal responsiveness. *J. Neurophysiol* 68: 2264-2269.
- \*Neely A and Lingle CJ (1992). Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol(Lond)* 453: 97-131
- \*Nisenbaum ES, Xu ZC and Wilson CH (1994). Contribution of a slowly inactivating potassium current to the transition to firing of neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurophysiol.* 71(3): 1174-1189.
- \*Nisenbaum ES and Wilson CH (1995). Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J. Neurosci.*15(6): 4449-4463.
- \*Nisenbaum ES, Wilson CJ, Foehring RC and Surmeier DJ (1996). Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J Neurophysiol.* 76: 1180-1194.
- \*Park YB (1994). Ion selectivity and gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* 481(3): 555-570.
- \*Pedernazi P and Storm J (1993). PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the  $\text{K}^+$  current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron.*11:1023-1035.
- \*Pedernazi P and Storm J (1995). Dopamine modulates the slow  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  current  $I_{\text{AMP}}$  via cyclic AMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *J.Neurophysiol.* 74(6): 2749-2753.
- \*Pennefather P, Lancaster B, Adams PR and Nicoll R (1985). Two distinct  $\text{Ca}$ -dependent  $\text{K}$  currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 82: 3040-3044
- \*Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J and Capon DJ (1988). Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334: 434-437.
- \*Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M and Aceves J (1992). Apamin and charibdotoxin sensitivity of the calcium dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J. Neurophysiol* 68: 287-294
- \*Pineda JC, Bargas J, Flores Hernandez J and Galarraga E (1995). Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur. J. Pharmacol* 281: 271-277.
- \*Pongs O (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 72: S69-88
- \*Reinhart PH, Chung S, Levitan IB (1989). A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. *Neuron* 2: 1031-1041.
- \*Reinhart PH, Chung S, Martin BL, Brautigam DL, Levitan IB (1991). Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatase 2A. *J Neurosci* 11: 1627-1635.



- \*Reinhart PH and Levitan IB (1995). Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. *J. Neurosci.* 15(6): 4572-4579.
- \*Robitaille R and Charlton MP (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12(1): 297-305.
- \*Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ and Charlton MP (1993). Functional colocalization of calcium and calcium gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11: 645-655
- \*Rudy B(1988). Diversity and ubiquity of K<sup>+</sup> channels. *Neurosci.* 25: 729-749
- \*Sah Pankaj and McLachlan E (1992). Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 68(5): 1834-1840.
- \*Sah Pankaj (1993). Kinetic properties of a slow apamin-insensitive Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> current in guinea pig vagal neurons. *J. Neurophysiol.* 69(2): 361-366
- \*Sah Pankaj (1996). Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *TINS* 19(4): 150-154.
- \*Sah P and Bekkers JM (1996). Apical dendritic location of slow afterhyperpolarization current in hippocampal pyramidal neurons: implications for the integration of long-term potentiation. *J. Neurosci.* 16(15): 4537-4542.
- \*Sawada M, Cleary LJ and Byrne HJ (1989). Inositol triphosphate and activators of protein kinase C modulate membrane currents in tail motor neurons in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 61: 302-310
- \*Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan YN and Jan LY (1988). Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature* (London) 331: 137-142.
- \*Schweitz H, Stansfeld CE, Bidard JN, Fagni L, Maes P and Lazdunski M (1989). Charybdotoxin blocks dendrotoxin-sensitive voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Febs Letters.* 250(2): 519-522.
- \*Schwindt PC, Spain WJ and Crill WE (1992). Calcium dependent potassium currents in neurons from cat sensorimotor cortex. *J. Neurophysiol.* 67(1): 216-226.
- \*Smith C, Phillips M and Miller C (1986). Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem.* 261: 14607-14613.
- \*Solaro CR and Lingle CJ (1992). Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* 257: 1694-1698.
- \*Solaro CR, Prakriya M, Ding JP and Lingle CJ (1995). Inactivating and non-inactivating Ca<sup>2+</sup> and voltage-dependent K<sup>+</sup> current in rat adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 15: 6110-6123.
- \*Storm JF (1987). Action potential repolarization and fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol* 385: 733-759
- \*Storm JF (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells En: *Progress in Brain Research* (J. Storm Mathisen, J. Zimmer and OP Ottersen). Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division). 161-187.
- \*Stuhmer W, Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker H, Giese KP, Perschke AB and Pongs O (1989). Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain *EMBO J.* 8(11): 3235-3244
- \*Surmeier DJ, Vargas J and Kitai ST (1988). Voltage-clamp analysis of a transient potassium current in rat neostriatal neurons. *Brain Res.* 473: 187-192.

- \*Surmeier DJ, Foehring R, Stefani A and Kitai ST (1991). Developmental expression of a slowly-inactivating voltage dependent potassium current in rat neostriatal neurons. *Neurosci Lett.* 122: 41-46.
- \*Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC and Greengard P (1995). Modulation of calcium currents by a D<sub>1</sub> dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14: 385-397.
- \*Toselli M and Lux HD (1989). GTP-binding proteins mediate acetylcholine inhibition of voltage dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Pflügers Arch* 415: 255-261.
- \*Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ and Reinhart PH (1994). Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel isoforms from human brain. *Neuron* 13:1315-1330.
- \*Tseng-Crank J, Godinot N, Johansen TE, Ahring PK, Strobaek D, Mertz R, Foster CD, Olesen SP and Reinhart PH (1996). Cloning, expression, and distribution of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunit from human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9200-9205.
- \*Tucker TH and Fettiplace R (1996). Monitoring calcium in turtle hair cells with a calcium activated potassium channel. *J. Physiol.* 494(3): 613-626.
- \*Vergara, C and Latorre R. (1983). Kinetics of Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> blockade. *J Gen Physiol* 226: 543-568
- \*Villaruel A, Alvarez O, Oberhayser A and Latorre R (1988). Probing a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel with quaternary ammonium ions. *Pflügers Arch.* 413: 118-126.
- \*Wallner M, Meera P and Toro L (1996). Determinant for  $\beta$ -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N-terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 14922-14927
- \*Wang XY, McKenzie JS and Kemm RE (1996). Whole-cell K<sup>+</sup> currents in identified olfactory bulb output neurones of rats. *J. Physiol.* 490(1): 63-77.
- \*Wei A, Solaro C, Lingle CJ and Salkoff (1994). Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron* 13: 671-681.
- \*Wilson CJ (1998) The basal ganglia. In: *The Synaptic Organization of the Brain* 4a ed. (Ed: Sheperd GM). Oxford UP., New York. pp: 329-375.
- \*Yarom Y, Sugimori M and Llinás R (1985). Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons in vitro. *Neuroscience* 16: 719-737.
- \*Zhang L and McBain C (1995). Potassium conductances underlying repolarization and afterhyperpolarization in rat CA1 interneurons. *J.Physiol.* 488(3): 661-672.