

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**

**"MODULACIÓN MUSCARÍNICA DE LAS  
CORRIENTES DE CALCIO EN NEURONAS  
NEOESTRIATALES DE PROYECCIÓN".**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

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

**TAMARA PEREZ ROSELLO**

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

**MÉXICO, D.F.**

**2005**

m343506

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

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.

A lo largo del Doctorado conté con una Beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM. Al inicio, y al final del Doctorado recibí apoyo de la DGAPA.

El presente trabajo fue financiado por :  
DGAPA-UNAM: IN219304, IN201603, IN200803, IN201603.  
CONACYT: 31389, 42636.  
The Millennium Research Initiative: W- 8072 No. 35806- N.  
Firca- NIH: TWO1214.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Magaly y Alberto

A mi abuela Margarita

A mi hermana Deborah

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Bargas le agradezco infinitamente su apoyo incondicional y su excelente tutoría sin los cuales no hubiera sido posible la realización exitosa de esta tesis. Gracias, José.

A la Dra. Elvira Galarraga, por su valiosa asesoría dentro de mi comité tutorial, y por sus consejos y ayuda fuera del mismo.

A los restantes miembros de mi comité tutorial los doctores Froylán Gómez Lagunas y Arturo Ortega Soto por sus valiosos y oportunos comentarios.

A los sinodales: Dr. Jorge Aceves Ruiz, Dra. Mirna Dent, Dr. Jorge Flores Hernández, Dr. Froylán Gómez Lagunas, Dra. Martha Pérez Armendáriz, y Dr. Luis Vaca Domínguez; por sus enriquecedores comentarios, y sugerencias al presente trabajo.

A Alejandra Figueroa, Humberto Salgado, Carmen Vilchis, Jaime N. Guzmán, y Fatuel Tecuapetla; por su colaboración en los experimentos que aparecen en el artículo publicado.

A mis compañeros y amigos de setup: Humberto, Carmen, y Azucena; por compartir los gajes del oficio, y por su gran ayuda.

Al resto de mis compañeros y amigos del laboratorio: Ramiro, Jaime Napoleón, Dagoberto, Osvaldo, Ernesto; Antonio, Luis Carrillo, Salvador, Juanito, Fatuel, Alejandra, Jaime Barral, Edén, Luis Galindo, Enrique, César, Calixto, Miriam, Lucía, y Elizabeth; por su apoyo y por compartir todo este tiempo.

Al resto de compañeros y amigos del IFC: Xochitl, Fernando, Silvia, Javier, Jimena, Yazmín, Raquel, Paz, y Elena; por su ayuda y consejos.

A mis amigos, mi familia adoptiva dentro y fuera de México: Minerva, Gretel, Inés, Juan Luis, Javier, Gema, Alejandro, Ricardo, Beatriz, Liv, Santana, Vigil, Gustavo; Elías, Yayo y Liz; por su gran respaldo y apoyo incondicional.

A mi familiares y amigos dentro y fuera de Cuba; por sus porras y buenas vibras.

Al Dr. Julio Morán y a Sara Noguera; por su apoyo y consejos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad y apoyo para estudiar en tierras mexicanas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Abreviaturas</b> .....	vii
<b>Resumen</b> .....	ix
<b>Summary</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Ganglios basales .....	3
2.2 Neuronas espinosas medianas e interneuronas colinérgicas.....	7
2.3 Receptores muscarínicos neostriatales. ....	11
2.4 Acetilcolina: neuromodulador de la excitabilidad en las neuronas .....	16
estriatales de proyección.....	16
2.5 Canales de calcio y su modulación muscarínica en las neuronas.....	18
estriatales de proyección.....	18
2.6 Vías de señalización intracelular más comunes utilizadas por la acetilcolina al activar a los receptores muscarínicos.....	22
2.7 Vía de la fosfolipasa C.....	22
2.7.1 Proteína cinasa C y canales de calcio.....	24
2.7.2 Muscarina y fosforilación de los canales de calcio por la proteína.....	26
cinasa C.....	26
2.8 Vía de la adenilato ciclasa.....	28
2.9 Modulación de los canales de calcio a través de la acción directa de las .....	29
proteínas G.....	29
2.10 Vías alternas usadas por la acetilcolina al activar a los receptores.....	30
muscarínicos.....	30
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	33
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 Hipótesis.....	33
3.2 Objetivos .....	33

<b>CAPÍTULO 4</b> .....	34
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	34
4.1 Obtención de neuronas disociadas .....	34
4.2 Registro electrofisiológico .....	35
4.3 Fármacos utilizados .....	36
4.4 Análisis de los datos .....	37
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	38
5.1 Resultados I .....	38
5.2 Resultados II .....	39
5.2.1 Participación de la vía de la fosfolipasa C en la inhibición muscarínica de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ .....	39
5.2.2 Participación de la proteína cinasa C .....	41
5.2.3 ¿Hay suficiente evidencia para involucrar a la vía $G_{q/11}$ / PLC/ DAG/PKC? .....	43
5.2.4 Participación de una vía delimitada a membrana .....	46
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	48
<b>DISCUSIÓN</b> .....	48
6.1 Inhibición de la corriente de calcio total en las neuronas espinosas medianas .....	49
6.2 Participación del receptor $M_1$ en la modulación de la corriente de calcio de la familia $Ca_v1$ (L) en las neuronas espinosas medianas .....	50
6.3 Modulación muscarínica de la corriente de calcio $Ca_v2$ en las neuronas espinosas medianas por la activación del receptor muscarínico $M_1$ .....	51
6.4 Implicaciones funcionales de la modulación muscarínica $M_1$ sobre los canales de la familia $Ca_v2$ en las neuronas estriatales de proyección .....	53
6.5 Vía de señalización del receptor $M_1$ .....	57
6.6 Conclusiones .....	59
6.7 Sumario .....	60
6.8 Perspectivas .....	61
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	62

## Abreviaturas

<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>BIS</b>	Bisindolilmaleimida
<b>CaM</b>	Calcio calmodulina
<b>CaMKII</b>	Calcio calmodulina cinasa II
<b>Cx</b>	Corteza cerebral
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>ENH</b>	Homóloga de enigma
<b>ICa</b>	Corrientes de calcio
<b>IP3</b>	Inositol 1, 4, 5- trisfosfato
<b>GC</b>	Guanilato ciclasa
<b>GB</b>	Ganglios basales
<b>GPe</b>	Globo pálido externo
<b>GPI</b>	Globo pálido interno
<b>mAChRs</b>	Receptores muscarínicos
<b>MT- 1</b>	Toxina muscarínica 1
<b>MT- 3</b>	Toxina muscarínica 3
<b>MT- 7</b>	Toxina muscarínica 7
<b>nAChRs</b>	Receptores: nicotínicos
<b>NEMs</b>	Neuronas espinosas medianas de proyección
<b>NS</b>	Neostriado
<b>NST</b>	Núcleo subtalámico
<b>NT</b>	Neurotransmisores
<b>PI</b>	Fosfoinositidos
<b>PI3K</b>	Cinasa de fosfoinositidos 3
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol 4,5- bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PKCc</b>	Proteína cinasa clásicas
<b>PKCn</b>	Proteína cinasa nuevas



<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PMA</b>	Forbol miristato acetato
<b>PPH</b>	Postpotencial hiperpolarizante
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>SNr</b>	Sustancia negra reticulada
<b>SNC</b>	Sustancia negra compacta
<b>TANs</b>	Neuronas activas de manera tónica
<b>TK</b>	Tirosina cinasa
<b>ω-AgaTK</b>	ω-agatoxina TK
<b>ω-CgTx</b>	ω-conotoxina GVIA

## Resumen

La acetilcolina es un neuromodulador importante de la función neocortical a través de la activación de receptores muscarínicos. Las neuronas espinosas medianas del neocórtex conforman la salida de este núcleo a otros núcleos de los ganglios basales. Estas neuronas expresan dos tipos de receptor muscarínico:  $M_1$  y  $M_4$ . Se ha reportado que la activación de estos receptores muscarínicos reduce las corrientes de  $Ca^{2+}$ . En este estudio utilizamos antagonistas muscarínicos específicos para identificar el receptor muscarínico responsable de este efecto. Con antagonistas específicos de los canales de calcio investigamos los canales blanco de esta modulación. Finalmente estudiamos la vía de señalización intracelular implicada. Además de reducir las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $Ca_v1$ ), la muscarina y el agonista peptídico del receptor  $M_1$ , la MT-1, redujeron las corrientes a través de los canales  $Ca_v2.1$  (P/Q) y  $Ca_v2.2$  (N). Esta modulación fue bloqueada, casi en su totalidad, por el péptido MT-7, antagonista específico de los receptores muscarínicos de tipo  $M_1$  pero no fue reducida significativamente por el péptido MT-3, antagonista específico de los receptores muscarínicos de tipo  $M_4$ . De acuerdo con esto, la MT-7, pero no la MT-3, bloqueó la reducción del postpotencial hiperpolarizante (PPH) y disminuyó las corrientes gabaérgicas postsinápticas inhibitorias (IPSCs) producidas por las colaterales axónicas que interconectan a las neuronas espinosas medianas. Se sabe que ambas funciones dependen de los canales de  $Ca^{2+}$  P/Q y N. La acción sobre las IPSCs fue presináptica pues se observó un incremento en la relación entre pulsos pareados. El bloqueador de la fosfolipasa C (PLC), U-73122, redujo la modulación muscarínica  $M_1$ . La modulación también se redujo por los inhibidores de la proteína cinasa C (PKC): la bisindolilmaleimida y el péptido PKC 19-36. Como era de esperarse, el activador de la PKC, el éster de forbol 12-miristato 13-acetato mimetizó la modulación muscarínica y ocluyó las acciones de los agonistas. Las acciones muscarínicas no fueron dependientes de voltaje y tampoco mostraron las características

de una interacción delimitada a membrana entre las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G y la subunidad  $\alpha_{1A}$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos resultados mostraron: primero, que la activación del receptor muscarínico  $M_1$  es el principal mecanismo colinérgico que modula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2.1$ , y  $\text{Ca}_v2.2$  en las neuronas espinosas neocorticales. Segundo, que parte de la modulación de los canales  $\text{Ca}_v2$  ocurre por la cascada de señalización de la PLC y PKC. Tercero, que la modulación muscarínica produce la facilitación postsináptica del disparo y la inhibición presináptica del control gabaérgico mediado por las colaterales axónicas. En conjunto, ambos efectos producirán mayor reclutamiento de neuronas espinosas para la misma tarea.

## Summary

Acetylcholine is an important neuromodulator of neostriatal function through the activation of muscarinic receptors. Striatal medium spiny neurons originate the output pathway of the neostriatum to other basal ganglia nuclei. These neurons express two types of muscarinic receptors:  $M_1$  and  $M_4$ . It has been reported that activation of muscarinic receptors modulates  $Ca^{2+}$  currents. We used specific  $M_1$  and  $M_4$  muscarinic antagonists to identify the muscarinic receptor responsible for this effect. With specific calcium channel antagonist we searched for the targets of this modulation. Furthermore, we studied the intracellular signaling pathway for this modulation. Besides a reduction of L-type  $Ca^{2+}$  currents ( $Ca_v1$ ), muscarine and the peptidic  $M_1$ -selective agonist, MT-1, reduced currents through  $Ca_v2.1$  (P/Q) and  $Ca_v2.2$  (N)  $Ca^{2+}$  channel types. This modulation was strongly blocked by the peptide MT-7, the specific muscarinic  $M_1$ -type receptor antagonist but not significantly reduced by the peptide MT-3, the specific muscarinic  $M_4$ -type receptor antagonist. Accordingly, MT-7, but not MT-3, blocked a muscarinic reduction of the afterhyperpolarizing potential (AHP) and decreased the GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) produced by axon collaterals that interconnect spiny neurons. Both these functions are known to be dependent on P/Q and N types  $Ca^{2+}$  channels. The action on the AHP had an important effect in increasing firing frequency. The action on the IPSCs was shown to be produced presynaptically as it coursed with an increase in the paired pulse ratio. The phospholipase C (PLC) blocker, U-73122, reduced the muscarinic  $M_1$  modulation. This modulation was also reduced by the protein kinase C (PKC) inhibitors, bisindolylmaleimide and PKC 19-36. Accordingly, the PKC activator phorbol 12- myristate 13- acetate mimicked the muscarinic modulation and occluded the agonist actions. It was found that muscarinic actions on spiny cells were not voltage dependent and did not exhibit the distinguishing marks of a direct membrane

delimited interaction between G-proteins  $\beta\gamma$  subunits and the channel  $\alpha_{1A}$  subunit. These results show: first, that muscarinic  $M_1$ -type receptor activation is the main cholinergic mechanism that modulates  $Ca^{2+}$  entry through voltage dependent  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2.1$ , y  $Ca_v2.2$  channels in spiny neurons. Second that part of the  $Ca_v2$  channels modulation occurred by a phospholipase C signaling cascade. Third, this muscarinic modulation produces a postsynaptic facilitation of discharge and the presynaptic inhibition of the GABAergic control mediated by axon collaterals. Together, both effects would tend to recruit more spiny neurons for the same task.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCION

La acetilcolina (ACh) es uno de los mayores neurotransmisores del sistema nervioso central y periférico (Caulfield y Birdsall 1998). Se une a dos clases distintas de receptor: nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs). Los receptores nAChRs son canales catiónicos que se abren en respuesta a la ACh, mientras que los mAChRs pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Dani 2001; Caulfield y Birdsall 1998; Wess 2004). Al unirse a los nAChRs, la ACh media tanto acciones de transmisión sináptica rápida como importantes acciones moduladoras (Dani 2001). Al actuar sobre los mAChRs, la ACh ejerce acciones moduladoras presinápticas y postsinápticas (Brown et al. 1997; Jones 1993; Krnjevic 2004; Wess 2004).

Los receptores muscarínicos se encuentran prácticamente en todo tipo celular (Levey 1993; Vilaro 1993). Los receptores muscarínicos periféricos median funciones como la reducción en la frecuencia cardíaca, la estimulación de la secreción glandular, y la contracción del músculo liso (Levine 2001; Wess 2004). Por su parte, los mAChRs centrales participan en la regulación de funciones cognitivas, sensoriales, motoras, conductuales y autonómicas (Levine 2001; Wess 2004). Muchas enfermedades del sistema nervioso se relacionan con cambios en la transmisión colinérgica-muscarínica, ya sea en los receptores como en las concentraciones de acetilcolina (Eglen et al. 2001; Wess 2004).

Uno de los núcleos del cerebro donde se encuentran las concentraciones más altas de ACh, así como una alta expresión de los mAChRs, es el neocórtex (NS) (Volpicelli y Levey 2004, Vilaro et al. 1993). El neocórtex es el principal núcleo de entrada de los ganglios basales. Es una estructura fundamental para la ejecución de los movimientos, el

mantenimiento de la postura, y la asociación de aspectos cognitivos y sensoriales relacionados con el movimiento (Middleton y Strick 2000; Takakusaki et al. 2004; Wilson 2004). Las enfermedades motoras como el mal de Parkinson se asocian a cambios en los niveles de ACh estriatal (Pisani et al. 2003). El uso de anticolinérgicos es una de las terapias secundarias más usadas en la práctica clínica (Schrag 1999) para esta enfermedad.

A nivel molecular, muchas de las funciones de la ACh en el sistema nervioso central y periférico están dadas por sus efectos sobre una gran variedad de conductancias iónicas (Brown et al. 1997; Jones 1993; Krnjevic 2004) y el neostriado no es la excepción (revisado en Calabresi et al. 2000 y Wilson et al. 2004). Sin embargo en la mayor parte de estas acciones no se conocen los receptores muscarínicos que las median. La identificación de los receptores muscarínicos responsables de estos efectos es crucial no sólo para el conocimiento básico del funcionamiento de este núcleo sino para un mejor diseño del tratamiento de muchas enfermedades neurodegenerativas. En el presente trabajo estudiamos la modulación muscarínica de las conductancias de calcio dependientes de voltaje en las neuronas principales del neostriado. Identificamos el principal tipo de receptor muscarínico que media esta modulación así como parte de la vía de señalización que es activada por el mismo. También dilucidamos los subtipos de canal de calcio blanco de las acciones colinérgicas.

## CAPÍTULO 2

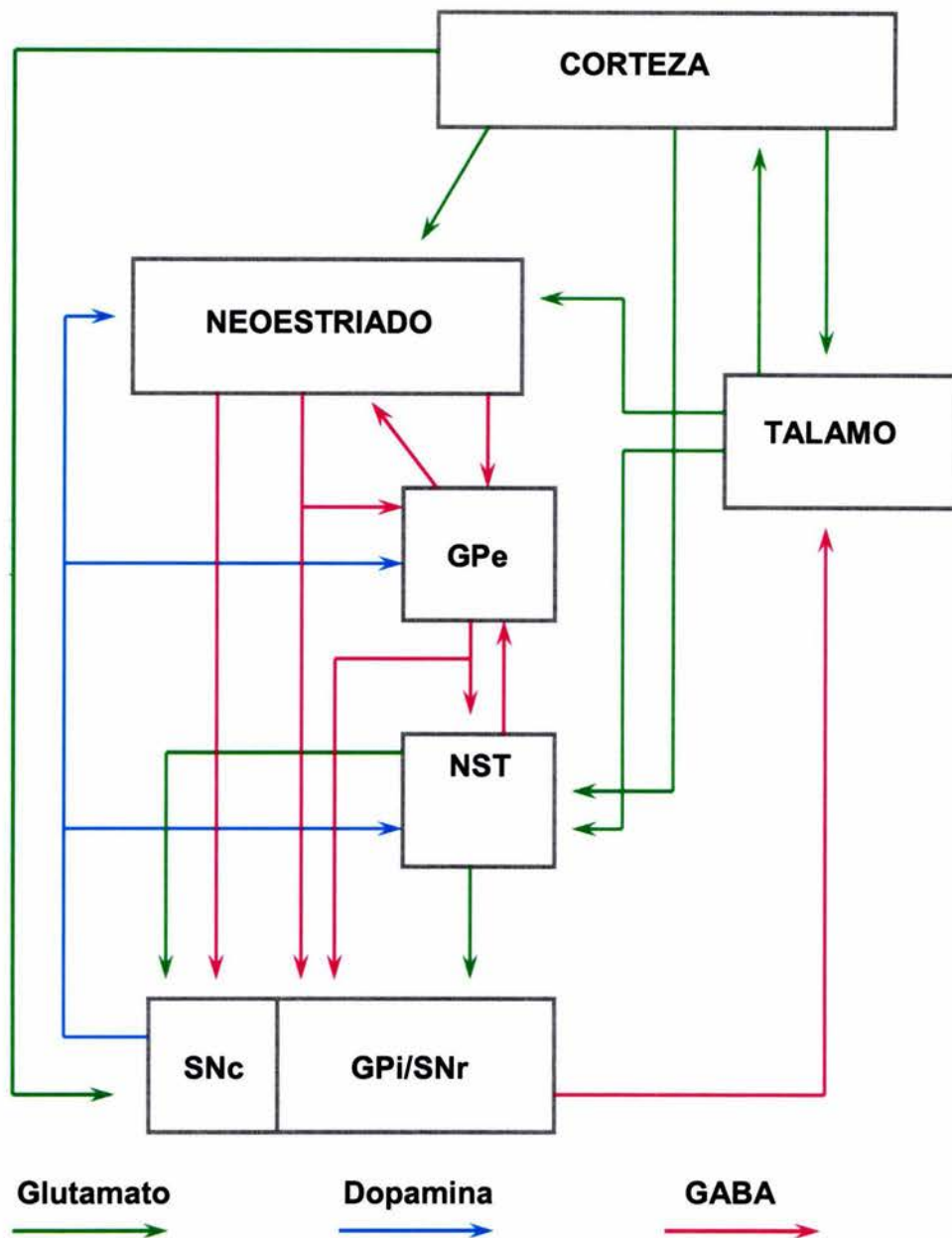
### ANTECEDENTES

#### 2.1 Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales situados en el cerebro medio y anterior de los vertebrados, que procesan y asocian información proveniente de varias áreas corticales, así como de otros núcleos del cerebro como el tálamo (revisado en Wilson 2004). Los núcleos principales de esta estructura son: el neostriado, formado por el caudado y el putamen, el globo pálido interno (GPi), el globo pálido externo (GPe), la sustancia negra reticulada (SNr), la sustancia negra compacta (SNc), y el núcleo subtalámico (NST) (Figura 1). Inicialmente se le atribuyó a los GB un papel puramente motor, esto es la ejecución de movimientos voluntarios (Wilson 2004). En los últimos años se han acumulado muchas evidencias acerca de la participación de esta red neuronal en el procesamiento cognitivo (memoria y aprendizaje) y sensorial que conduce a la planeación de secuencias complejas de movimientos motores y la memoria de procedimientos (Middleton y Strick 2000; Wilson 2004). Los ganglios basales también participan en el control de la postura y en los aspectos automáticos del control del movimiento (Takakusaki et al. 2004). La degeneración de los ganglios basales está implicada en diversas enfermedades motoras como la enfermedad de Parkinson, la Corea de Huntington, y el síndrome de Tourette (Mink 1996; Wilson 2004).

Dentro de los ganglios basales, el neostriado es considerado el principal núcleo de entrada, y el primer nivel de procesamiento de la información proveniente de la corteza cerebral (Cx) y del tálamo (revisado en Wilson 2004). El globo pálido interno y la sustancia negra reticulada son los núcleos de salida que proyectan a otras estructuras fuera de los ganglios basales como son el tálamo, el colículo superior, los núcleos pedúnculo pontinos, y la formación reticular. El globo pálido externo, el NST, y la SNc funcionan





**Figura 1. Esquema de la organización anatómo- funcional de los ganglios basales (GB) de la rata.**

El neostriado (NS) es el principal núcleo a donde llegan las aferencias glutamatergicas de corteza. Este envía parte de sus proyecciones gabaérgicas, a través de la vía directa, al globo pálido interno (GPI), y a la sustancia negra reticulada (SNr). La otra parte de las salidas gabaérgicas conforman la vía indirecta, la cual está formada por dos sinapsis gabaérgicas en serie: neostriado- globo pálido externo (GPe)- núcleo subtalámico (NST), y termina con la sinapsis glutamatergica NST- GPI. La sustancia negra compacta (SNc) contiene a las neuronas dopaminérgicas, este núcleo envía sus proyecciones a prácticamente todos los núcleos que conforman los GB.

principalmente como núcleos intrínsecos de procesamiento aunque reciben entradas de la corteza y del tálamo. En la sustancia negra compacta se encuentran las neuronas dopaminérgicas que proyectan a otros núcleos de los ganglios basales como el NS, el NST, y a ambos segmentos del globo pálido (Smith y Kieval 2000).

En los ganglios basales, prácticamente todas las neuronas de proyección de los diferentes núcleos, excepto el subtálamo, son gabaérgicas inhibitorias. Las neuronas espinosas medianas de proyección (NEMs) son las neuronas principales del neostriado. Son neuronas gabaérgicas que pueden ser divididas en dos grupos principales dependiendo de los péptidos que secretan y del blanco postsináptico (revisado en Wilson 2004). Aproximadamente un 40 % de las NEMs contiene dinorfina y sustancia P y envían sus axones al GPi o a la SNr, o a ambos, pasando por el GPe. Otro 40 % expresan encefalinas y proyectan sólo al GPe. Existe también un reducido grupo, alrededor de un 15 %, que expresa ambos péptidos sustancia P y encefalinas, y que proyectan tanto al Gpe, como al GPi y a la SNr. Esta diferencia en los blancos de proyección de las neuronas espinosas medianas determina las interconexiones principales entre los diferentes núcleos de los ganglios basales a través dos vías: la vía directa y la indirecta (Fig. 1). La vía directa la conforman las neuronas de proyección gabaérgica que contienen sustancia P, y que proyectan a los núcleos de salida (globo pálido interno y sustancia negra reticulada). Las neuronas espinosas medianas de proyección de la vía indirecta son las encefalinérgicas, y envían sus axones sólo hasta el GPe. El posterior procesamiento se da con la proyección gabaérgica inhibitoria de este núcleo al NST, o a los núcleos de salida. El procesamiento final por esta vía lo determinan las conexiones glutamatérgicas excitatorias del NST con los núcleos de salida (Wilson 2004; ver Figura 1).

Las neuronas espinosas medianas de proyección no están activas tónicamente sino que disparan trenes de potenciales de acción con duración de entre 0.1 y 3 sec. En

contraposición, las células de ámbos globos pálidos y de la SNr disparan tónicamente a frecuencias de alrededor de 20 Hz. Este disparo tónico de las neuronas de los núcleos de salida produce una inhibición constante de las neuronas del tálamo y del colículo superior. El arribo coincidente de entradas excitatorias del tálamo y de las distintas áreas corticales sobre las neuronas espinosas medianas de proyección provoca el disparo de estas (Wilson 2004).

Teniendo en cuenta la existencia de estas dos vías, durante mucho tiempo la realización de los movimientos se ha explicado mediante el modelo del procesamiento paralelo a través de las mismas. El disparo de las NEMs de la vía directa produce la desinhibición de la salida gabaérgica al tálamo provocando un incremento en la excitación talámica de la Cx. Por otra parte, la actividad de las NEMs de la vía indirecta provoca una mayor inhibición de las neuronas del GPe, y por tanto una desinhibición de las neuronas glutamatérgicas del NST. El incremento de la salida glutamatérgica del NST conlleva al aumento de la salida gabaérgica al tálamo disminuyendo así la excitación talámica de la Cx. Así, se propone que la activación de la vía directa facilita el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta disminuye los movimientos (Mink 1996). Otro modelo que también trata de explicar el movimiento es el de selección e inhibición de programas motores. En este caso la vía indirecta inhibiría a los programas motores que no se utilizarán pero que compiten con el que sí se utilizará, y la directa seleccionaría el programa que se utilizará (Mink 1996). Aunque la interconexión dentro de la estructura de los GB es mucho más compleja, estos modelos ayudan a explicar la regulación de los movimientos o secuencias de movimientos.

Estas son las conexiones más estudiadas, sin embargo existen otras conexiones que en los últimos años han cobrado gran relevancia funcional, como la entrada directa de corteza al NST (vía hiperdirecta) y a la SNc, así como la proyección dopaminérgica a las neuronas espinosas medianas de proyección (Wilson 2004). De hecho, recientemente se

ha propuesto un nuevo modelo en donde las tres vías (hiperdirecta, directa e indirecta) estarían participando para garantizar la ejecución de los movimientos deseados (Nambu 2004).

En los ganglios basales todas estas conexiones, de una vía u otra, son reguladas por neurotransmisores (NT) como la ACh y la dopamina (DA) modificando de esta forma la información proveniente de la corteza y del tálamo (Calabresi et al. 2000; Nicola et al. 2000). La interacción o "balance" entre estos dos NT se ha planteado como fundamental para el funcionamiento de estas estructuras (Di Chiara et al. 1994; Harzing y Zigmond 1998). Sin embargo, muchos aspectos de las acciones de estos NT a nivel celular y sináptico, se desconocen, por lo que los modelos arriba mencionados son altamente especulativos y lo seguirán siendo mientras estas acciones no se dilucidan. Es importante hacer notar, sin embargo, que los antagonistas y agonistas de estos dos importantes NT (ACh y DA) son utilizados en la clínica de manera empírica para el tratamiento de desórdenes motores. En todos los núcleos de los GB existe una regulación colinérgica importante a través de receptores nicotínicos y muscarínicos (Zhou et al. 2003). En nuestro trabajo nos enfocamos a la modulación colinérgica de naturaleza muscarínica en el neocórtex; donde se alcanzan los niveles más altos de este neuromodulador (Vilaro et al. 1993).

## **2.2 Neuronas espinosas medianas e interneuronas colinérgicas.**

El neocórtex contiene varias poblaciones celulares, las neuronas principales o de proyección y varias clases de las interneuronas. Como mencionamos en el apartado anterior las células principales son las neuronas espinosas medianas de proyección. Tres clases principales de interneuronas son: colinérgicas, gabaérgicas que contienen parvalbúmina, y gabaérgicas que sintetizan y liberan somatostatina (Wilson 2004).

Las neuronas espinosas medianas de proyección constituyen el 95 % de las células de este núcleo en la rata, usan GABA como neurotransmisor, y coliberan encefalinas, dinorfina o sustancia P. Las neuronas espinosas medianas de proyección que liberan sustancia P y dinorfina proyectan principalmente a la SNr y al GPi, mientras que las que liberan encefalinas proyectan principalmente hacia el GPe. Ambos grupos de neuronas pueden dejar colaterales en los núcleos que inerva el otro grupo (Parent et al. 2000). Las NEMs presentan abundantes colaterales axónicas dentro del mismo neostriado (Wilson 2004), a través de estas contactan a otras neuronas espinosas medianas de proyección y a las interneuronas. Recientemente varios autores han mostrado electrofisiológicamente que efectivamente las NEMs utilizan estas colaterales axónicas para inhibirse unas a otras a través de corrientes gabaérgicas postsinápticas (Guzmán et al. 2003; Tepper et al. 2004).

En cuanto a la distribución celular de las neuronas espinosas medianas algunos autores plantean que las mismas están dispersas en igual número a través del estriado (Gerfen y Wilson 1996). Sin embargo, otros han encontrado que las NEMs que proyectan a los mismos sitios pueden encontrarse formando grupos neuronales (Kawaguchi 1997). Debido a que las conexiones aferentes y eferentes de las NEMs se encuentran organizadas de manera parcheada, se considera que estas neuronas pueden estar organizadas en módulos (Prensa et al. 1999).

Las interneuronas colinérgicas constituyen alrededor del 2 % de las neuronas estriatales, pero a pesar de su pequeño número, el estriado tiene una de las concentraciones más altas de ACh de todo el cerebro (Vilario et al. 1993; Volpicelli y Levey 2004). Esto se debe a la densa inervación local que cada interneurona deja. Estas interneuronas hacen sinapsis con las NEMs en las dendritas distales y en el cuello de las espinas dendríticas. Además hacen sinapsis con las interneuronas gabaérgicas (revisado en Pisani et al. 2003; Wilson et al. 2004; Zhou et al. 2003).

Estas interneuronas no están distribuidas al azar sino que, al parecer, se encuentran a distancias constantes de entre 400 a 800  $\mu\text{m}$  unas de otras (Aosaki 1995). Estas células presentan un denso pleno axonal que puede extenderse hasta 1mm, por lo que una interneurona colinérgica hace sinapsis con un gran número de neuronas espinosas medianas (Wilson 2004).

Las gigantes colinérgicas reciben aferencias de la corteza y del tálamo, aunque se ha visto que presentan una actividad tónica autónoma determinada por las conductancias intrínsecas de su membrana (Bennett y Wilson 1999; Bennett et al. 2000). Debido a esta actividad tónica, conspicua, al registrarlas extracelularmente *in vivo*, a las interneuronas gigantes colinérgicas se les denomina TANs ("tonic active neurons" o "neuronas activas de manera tónica"). Las TANs responden a estímulos asociados con la recompensa y el aprendizaje, así como a estímulos aversivos (Apicella 2002; Yamada et al. 2004). Estas neuronas son capaces de discriminar entre diferentes tipos de instrucciones asociadas a la recompensa. Las TANs también codifican el inicio de las acciones a realizar cuando se espera una recompensa (Yamada et al. 2004). El cambio fásico en el disparo de estas interneuronas podría representar una señal para las NEMs indicando que un estímulo relevante desde el punto de vista motivacional ha sido presentado (Apicella 2002). Probablemente el disparo sincronizado de varias TANs este contribuyendo al procesamiento local organizado de las entradas corticoestriatales que transmiten información sensoriomotora y cognitiva hacia las NEMs (Yamada et al. 2004).

Las interneuronas gabaérgicas del NS reciben entradas excitatorias de la Cx. Estas interneuronas inhiben poderosamente a las NEMs, y se pueden inhibir entre ellas mismas o a las interneuronas colinérgicas (Wilson et al. 2004). Las reglas de conexión entre estas neuronas, o cual es el papel preciso de cada una de ellas en la red estriatal, son tópicos desconocidos a la fecha.

La actividad eléctrica de las neuronas espinosas medianas se correlaciona con el

movimiento pues parece codificar varios aspectos del mismo (Mink 1996; Ueda y Kimura 2003). La lesión experimental o patológica de las neuronas espinosas neocorticales produce anomalías en el movimiento (Mink 1996). El patrón de disparo de estas células es el resultado de la interacción dinámica entre las propiedades intrínsecas de la membrana y las entradas sinápticas. Esta interacción hace que las NEMs presenten dos estados preferentes en su actividad. Un estado silente que se conoce como “*down-state*”, en el cual la neurona se encuentra a potenciales de reposo de alrededor de  $-80$  mV y rara vez dispara. Y otro estado denominado “*up-state*”, que es el estado activo, cuando se produce el disparo neuronal. La mayor parte del tiempo las NEMs se encuentran silentes, y sólo cuando existen varias entradas excitatorias coincidentes se produce la transición del down al up state (Vergara et al. 2003; Wilson 2004). Las propiedades intrínsecas están determinadas por las diferentes conductancias iónicas dependientes de voltaje o del calcio intracelular y que además son moduladas por la activación de receptores asociados a proteínas G u otras cadenas de señalización (Bargas et al. 1989; Bargas et al. 1994; Bargas et al. 1999; Cantrell et al. 1995; Flores-Hernández et al. 1994; Nisenbaum 1995). Entre los diferentes neuromoduladores que son de interés por razones obvias están la dopamina, la acetilcolina, la somatostatina, la sustancia P y el glutamato (Calabresi et al. 2000; Graybiel 1990; Nicola et al. 2000; Vergara et al. 2003; Vilchis et al. 2002). Al regular las conductancias intrínsecas, estos neuromoduladores pueden provocar la transición entre los estados up y down del potencial de membrana, y por consiguiente influir en la proyección gabaérgica inhibitoria de estas neuronas hacia sus núcleos blanco.

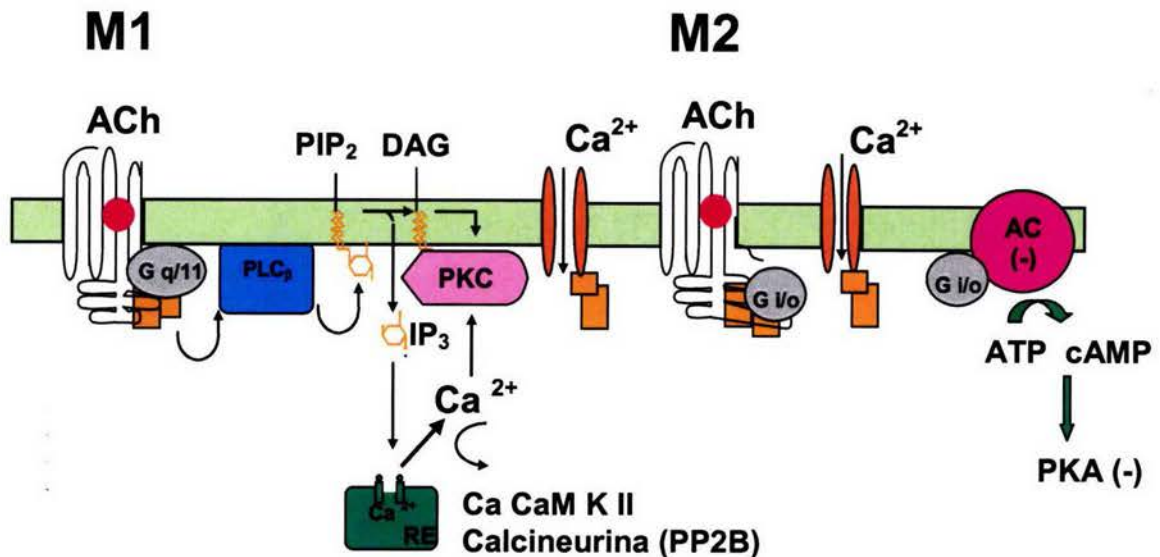
### 2.3 Receptores muscarínicos neostriatales.

La acetilcolina ejerce la mayor parte de sus efectos en el neostriado a través de cinco tipos de receptor muscarínico; los cuales han sido identificados genéticamente:  $m_1$  a  $m_5$  (Bonner et al. 1989). Los genes codifican para los diferentes tipos de receptor clasificados farmacológicamente:  $M_1$  a  $M_5$  (Caulfield y Birdsall 1998). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a las cadenas de señalización que se asocian con las proteínas G (Caulfield y Birdsall 1998; Wess 2004).

Dependiendo del tipo de proteína G activada, los receptores muscarínicos se clasifican dentro de la clase M1, conformada por los tipos:  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$ , o dentro de la clase M2, que contiene a los receptores  $M_2$  y  $M_4$  (Caulfield y Birdsall 1998; Felder 1995; Wess 2004) (Fig. 2). Los receptores de la clase M1 se acoplan preferencialmente a proteínas G del tipo  $G_q/G_{11}$ , insensibles a la toxina de Bordetella Pertussis (PTX). Estas proteínas G activan fundamentalmente la vía de los fosfoinosítidos (PI), y la proteína cinasa C (PKC). Los receptores de la clase M2 se acoplan a proteínas  $G_i/G_o$  sensibles a la PTX. Estas proteínas G pueden tener efectos directos sobre canales iónicos además de inhibir a la enzima adenilato ciclasa (AC) de membrana, y con ello disminuir los niveles de AMPc.

El neostriado es uno de los núcleos del cerebro que presenta una mayor expresión de receptores muscarínicos (Volpicelli y Levey 2004; Vilaro et al. 1993). Utilizando distintas técnicas: inmunocitoquímica, hibridación *in situ*; detección de RNAm en célula única, determinación de proteínas y *knockout* de genes; se han encontrado todos los subtipos de receptores muscarínico en el neostriado. Los receptores  $M_1$  y  $M_4$  son los receptores más abundantes. Los receptores  $M_2$ ,  $M_3$  y  $M_5$  también se expresan aunque en





**Figura 2. Principales vías de señalización activadas por los receptores muscarínicos de las clases M1 y M2.** La unión de la ACh a los receptores muscarínicos de la clase M1 activa preferentemente a la vía de la fosfolipasa C (PLC) a través de proteínas  $G_{q/11}$ . La unión a los de la clase M2 activa por un lado a las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_{i/o}$  (cuadrados amarillos), las cuales pueden actuar directamente sobre los canales de  $Ca^{2+}$ , o inhibir la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC). En ambas vías pueden ser activadas otras proteínas como la calcio calmodulina cinasa de tipo II (CaMKII), la fosfatasa calcineurina o PP2B, así como la cinasa de proteínas A (PKA) y la C (PKC).

menor cuantía (Bernard et al. 1992; Hersch y Levey 1995, Potter et al. 2004; Vilaro et al. 1993; Volpicelli y Levey 2004; Yan et al. 2001).

Los receptores que más se expresan en las NEMs son los del tipo  $M_1$ , encontrándose tanto el RNAm como la proteína en aproximadamente un 80 % de estas células (Alcantara et al. 2001; Bernard et al. 1992; Hersch y Levey 1995; Yan et al. 2001). Los estudios de inmunomicroscopía muestran que el receptor  $M_1$  se localiza postsinápticamente en los somas, dendritas y espinas de todas las NEMs, tanto en las que expresan sustancia P como en las que expresan encefalinas (Hersch y Levey 1995). La mayoría de los receptores  $M_1$  se localizan en las espinas dendríticas que se asocian con sinapsis

asimétricas excitatorias tanto en el cerebro de rata (Hersch y Levey 1995) como en los primates (Alcantara et al. 2001).

Los receptores del tipo  $M_4$  son los segundos más importantes, después de los  $M_1$ , expresados por las NEMs (Bernard et al. 1992; Hersch y Levey 1995; Yan et al. 2001). Hersch y Levey (1995) mostraron que en un 45 % de las células del NS se encuentra la proteína. Los receptores  $M_4$ , al igual que los  $M_1$ , también se localizan en los somas, dendritas y espinas de estas neuronas. Como se desprende del porcentaje de las neuronas espinosas medianas de proyección que presentan uno u otro receptor, es evidente que alrededor de un 40 % de estas células coexpresan ambos receptores. Varios estudios sugieren que las NEMs que proyectan a la SNr (vía directa) son las que expresan la mayor parte de receptores  $M_4$ , y por ende, son las que colocan a ambos subtipos de receptor (Bernard et al. 1992; Potter et al. 2004; Yan et al. 2001). El receptor de tipo  $M_3$  se encuentra en mucho menor porcentaje (Bernard et al. 1992; Hersch y Levey 1995), localizándose en las espinas de las dendritas distales de algunas neuronas, aunque no se encuentra marca somática. El receptor  $M_5$  es el que se ha detectado en menor cantidad, el RNAm para este receptor sólo se ha encontrado y en muy baja cantidad en alrededor de un 10 % de las NEMs (Yan et al. 2001).

En cuanto a los receptores muscarínicos presentes en los otros tipos celulares neocorticales; se sabe que las interneuronas colinérgicas expresan los receptores de los tipos  $M_2$  y  $M_4$  (Bernard et al. 1999; Hersch y Levey 1995). Los estudios de detección de RNAm en célula única demuestran la existencia de estos receptores en estas células (Yan y Surmeier 1996). En las terminales excitatorias provenientes de corteza se ha encontrado marca para los receptores  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  y  $M_4$ . La ACh, a través de estos receptores inhibe la liberación glutamatergica proveniente de corteza (Hernandez-Echeagaray et al. 1998).

**Faltan páginas**

**N° 14-15**

Hasta hace poco no se contaba con fármacos lo suficientemente selectivos para distinguir los efectos mediados por uno u otro receptor (Caulfield y Birdsall 1998; Jones 1993). En la actualidad se cuentan con las llamadas toxinas muscarínicas MT-3 y MT-7, antagonistas altamente específicos de los receptores de los tipos  $M_4$  y  $M_1$ , respectivamente (Karlsson et al. 2000; Potter et al. 2004). El empleo de estos péptidos ha permitido identificar efectos mediados por estos receptores en una gran cantidad de células y tejidos (Cuevas y Adam 1997; Marino et al. 1998; Olianias et al. 1998), e incluso, en el neocórtex (Olianias et al. 1998; Olianias et al. 1996; revisado en Potter et al. 2004).

#### **2. 4 Acetilcolina: neuromodulador de la excitabilidad en las neuronas estriatales de proyección.**

Uno de los efectos de la activación colinérgica de los receptores muscarínicos en el sistema nervioso central y periférico es la modulación de diferentes conductancias iónicas (Allen y Brown 1993; Jones 1993; Krnjevic 2004). Esto tiene una repercusión sobre el disparo neuronal y la liberación de neurotransmisores (Krnjevic 2004). La acetilcolina, a través de la activación de receptores muscarínicos, modula diferentes tipos de conductancias iónicas en las NEMs (Akins et al. 1990; Calabresi et al. 1998; Figueroa et al. 2002; Gabel y Nisenbaum 1999; Galarraga et al. 1999; Howe y Surmeier 1995; Hsu et al. 1996; Misgeld et al. 1986; Pineda et al. 1995).

Prácticamente, todas las conductancias de potasio resultan ser moduladas por la activación de los receptores muscarínicos postsinápticos (Akins et al. 1990; Gabel y Nisenbaum 1999; Hsu et al. 1996; Pineda et al. 1995). En el caso de la corriente transitoria rápida de potasio ( $I_{A1}$ ) los agonistas muscarínicos desplazan la curva de activación e inactivación a potenciales más negativos (Akins et al. 1991). Por otra parte, la curva de activación e inactivación de la corriente de potasio persistente ( $I_{Krp}$ ) está sujeta a

este mismo desplazamiento en la activación e inactivación sólo que acompañado de una reducción de la conductancia máxima (Gabel y Nisenbaum 1999). A potenciales hiperpolarizantes estas conductancias suprimen las entradas sinápticas excitatorias, mientras que a voltajes más despolarizados se incrementa la excitabilidad al aumentar la inactivación de estas corrientes. El rectificador entrante de potasio ( $I_{K_{ir}}$ ) también es inhibido por la activación de receptores muscarínicos (Figueroa et al. 2002; Galarraga et al. 1999; Hsu et al. 1996) facilitando la depolarización y el disparo de potenciales de acción. Por último, las corrientes de potasio activadas por calcio ( $I_{K_{Ca^{2+}}}$ ) también son blanco de las acciones muscarínicas como lo muestra la reducción del postpotencial hiperpolarizante (Pineda et al. 1995). Por otra parte, el trabajo de Figueroa y colaboradores (2002) sugiere que la acetilcolina, a través de la activación del receptor muscarínico  $M_4$ , está facilitando una conductancia de naturaleza catiónica.

Además de las corrientes intrínsecas dependientes de calcio y/o voltaje, la ACh modula la corriente postsináptica excitatoria dependiente de NMDA, a través de receptores muscarínicos. En este caso, la acetilcolina incrementa la amplitud de estas corrientes. Lo que se acompaña de un aumento en la depolarización y en la excitabilidad membranales (Calabresi et al. 1998).

Pero a pesar de que se conocen todas estas acciones muscarínicas, no se ha determinado con exactitud cual es el receptor muscarínico responsable de la mayoría de estos efectos, o cuando menos de los más importantes. Esto se ha debido a la falta de fármacos específicos que permitieran disecar las acciones mediadas por uno u otro receptor muscarínico ( $M_1$  y/o  $M_4$ ). El antagonista utilizado en la mayor parte de estos estudios, la pirenzepina, tiene mayor selectividad por el receptor  $M_1$  pero también antagoniza los efectos del receptor  $M_4$  (Calabresi et al. 1998; Hsu et al. 1996; Caulfield y Birdsall 1998), por lo que no es conveniente utilizarlo en una neurona que precisamente posee estos dos tipos de receptor.

Otras de las corrientes presentes en las NEMs y que son moduladas por la ACh, son las de calcio dependiente de voltaje (Howe y Surmeier 1995).

## **2. 5 Canales de calcio y su modulación muscarínica en las neuronas estriatales de proyección.**

Los canales de calcio dependientes de voltaje median la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células en respuesta a estímulos despolarizantes, como potenciales de acción y potenciales sinápticos. El  $\text{Ca}^{2+}$  que permea a través de estos canales participa como segundo mensajero en varios procesos celulares como son los de excitación neuronal, de transmisión sináptica, y expresión génica.

La actividad de los canales de calcio está regulada por una gran variedad de neurotransmisores, hormonas, péptidos y citocinas. Los principales mecanismos moleculares de regulación de los canales de calcio son los de fosforilación y defosforilación (Catterall 2000).

Los canales de calcio constituyen una gran familia de proteínas heteromultiméricas formadas por una subunidad principal  $\alpha_1$  y tres subunidades auxiliares ( $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  y  $\gamma$ ) (revisado en Catterall 2000; Doering y Zamponi 2003). La subunidad  $\alpha_1$  presenta cuatro dominios cada uno con seis segmentos transmembranales, y determina el poro del canal así como el tipo de canal de calcio pues presenta los sitios de unión para los agonistas y los antagonistas (Tabla 1).

Las subunidades auxiliares modulan varias de las propiedades funcionales de la subunidad  $\alpha_1$  como la amplitud de la corriente, su activación e inactivación. Estas subunidades también participan en el direccionamiento de la subunidad principal a la membrana celular. Hasta el momento se han encontrado 10 genes diferentes que

codifican para las subunidades  $\alpha_1$  (Tabla 1); cuatro para la  $\beta$ , cuatro para la  $\alpha_2/\delta$  y siete para la  $\gamma$ .

Estos canales han sido clasificados en los tipos T, N, L, P, Q y R teniendo en cuenta sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Los canales de calcio tipo T se activan a potenciales más hiperpolarizados (-70 a -60 mV), por lo que también se conocen como de bajo voltaje de activación (LVA o "low voltage activated"), y sólo se le han caracterizado bloqueadores medianamente selectivos como la kurtoxina. Hay tres tipos de canal T designados por las letras G, H e I ( $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  y  $\alpha_{1I}$ ). Por otra parte, los canales restantes se activan a potenciales más despolarizados (más positivos que -50 mV), por lo que se conocen como de alto voltaje de activación (HVA o "high voltage activated"). Los canales HVA no pueden ser distinguidos claramente teniendo en cuenta sus propiedades biofísicas, pero sí por sus propiedades farmacológicas, al existir bloqueadores muy selectivos para cada uno (ver Tabla 1). A partir de las características biofísicas y farmacológicas, se ha podido encontrar la correlación entre los genes que codifican para las subunidades  $\alpha_1$  y el tipo de canal de calcio nativo. Así, se sabe que la subunidad  $\alpha_{1A}$  codifica para los canales de calcio tipo- P/Q; la  $\alpha_{1B}$  para el tipo- N; las  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1F}$  y  $\alpha_{1S}$  designan los varios tipos de canal L y la  $\alpha_{1E}$  para el tipo R.

Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación para los canales de calcio, similar a la existente para los canales de potasio, que tiene en cuenta a los diferentes tipos de subunidades  $\alpha_1$ , así como a sus características biofísicas y farmacológicas (Tabla 1). La familia  $Ca_v1$  comprende a los canales de calcio tipo L, correspondiendo a cada tipo de subunidad  $\alpha_1$  una nueva nomenclatura. Por ejemplo, la subunidad  $\alpha_{1S}$  corresponde a la familia  $Ca_v1.1$ , la  $\alpha_{1C}$  a la  $Ca_v1.2$ , la  $\alpha_{1D}$  a la  $Ca_v1.3$  mientras que la  $\alpha_{1F}$  se denomina  $Ca_v1.4$ . La familia  $Ca_v2$ , está formada por los canales de tipo N, P/Q y R, y la  $Ca_v3$  por los de tipo T.

Tabla 1. Nomenclatura y farmacología de los canales de calcio dependientes de voltaje.  
(Adaptado de Doering y Zamponi, 2003 )

Superfamilia	Tipo	Subunidad $\alpha$	Nombre propuesto	Bloqueador selectivo
HVA	L	$\alpha_{1C}$	Ca <sub>v</sub> 1.2	Dihidropiridinas
		$\alpha_{1D}$	Ca <sub>v</sub> 1.3	
		$\alpha_{1F}$	Ca <sub>v</sub> 1.4	
		$\alpha_{1S}$	Ca <sub>v</sub> 1.1	
	N	$\alpha_{1B}$	Ca <sub>v</sub> 2.2	$\omega$ -conotoxina GVIA
	P/Q	$\alpha_{1A}$	Ca <sub>v</sub> 2.1	$\omega$ -agatoxina IVA
				$\omega$ -agatoxina TK
R	$\alpha_{1E}$	Ca <sub>v</sub> 2.3	SNX482	
LVA	T	$\alpha_{1G}$	Ca <sub>v</sub> 3.1	kurtoxina
		$\alpha_{1H}$	Ca <sub>v</sub> 3.2	
		$\alpha_{1I}$	Ca <sub>v</sub> 3.3	

Las neuronas espinosas medianas de proyección expresan los diferentes subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje de alto umbral: tanto los Ca<sub>v</sub>1 como los Ca<sub>v</sub>2. Los canales de calcio de tipo L (Ca<sub>v</sub>1) están constituidos por las subunidades  $\alpha_{1C}$  (Ca<sub>v</sub>1.2) y  $\alpha_{1D}$  (Ca<sub>v</sub>1.3). Los canales de calcio de tipo Ca<sub>v</sub>2 comprenden los canales P/Q (Ca<sub>v</sub>2.1), N (Ca<sub>v</sub>2.2) y R (Ca<sub>v</sub>2.3) (Bargas et al. 1994, Foehring et al. 2000; Mermelstein et al. 1999). Las conductancias de calcio son muy importantes en la generación del patrón de disparo neuronal. Los canales de calcio de tipo L (Ca<sub>v</sub>1) generan la zona de conductancia



negativa que sostiene el disparo repetitivo durante el estado activado de las NEMs (Hernández- López et al. 1997; Vergara et al. 2003). Los canales de calcio de tipo  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante (Vilchis et al. 2000), que determina el ritmo y la frecuencia de disparo. El calcio que entra a través de estos canales, provoca la liberación del neurotransmisor GABA de las terminales sinápticas de estas neuronas (Tecuapetla 2005).

Se ha sugerido que la activación de los receptores muscarínicos de los tipos  $M_1$  y  $M_4$  presentes en las NEMs enciende dos vías paralelas de señalización intracelular que inhiben a las corrientes de calcio  $Ca_v1$ , y  $Ca_v2$ , respectivamente (Howe y Surmeier 1995). En la presente tesis ponemos a prueba esta hipótesis que fue planteada en analogía con los hallazgos en otras células (Hille 1994): la activación de los receptores de tipo  $M_1$  modularía exclusivamente a la corriente de calcio  $Ca_v1$ , probablemente activando la vía de los fosfoinosítidos, y finalmente la defosforilación del canal por calcineurina (Rakhilin et al. 2004). Por otra parte, los receptores de tipo  $M_4$  modularían los canales de calcio  $Ca_v2$  mediante la acción directa de las proteínas G sobre los canales.

Una primera inconsistencia de la hipótesis planteada arriba se halló al observar que el postpotencial hiperpolarizante producido por las corrientes de potasio activadas por  $Ca^{2+}$  (Pineda et al. 1992), y que depende de las corrientes  $Ca_v2$  (Vilchis et al 2000), es inhibido por agonistas muscarínicos más selectivos para el receptor  $M_1$  (Pineda et al. 1995). Esto produce un aumento en la frecuencia de disparo de estas células. Sin embargo, como no se contaba con fármacos suficientemente selectivos para distinguir entre los receptores muscarínicos  $M_1$  y  $M_4$ , no había sido posible, hasta la presente tesis, determinar con precisión el receptor que media la inhibición de las corrientes de calcio  $Ca_v2$ . Por lo tanto, también se desconocía por completo la vía de señalización activada. En la presente tesis hicimos uso de los fármacos más selectivos con que a la fecha se cuenta para resolver este problema.

## **2. 6 Vías de señalización intracelular más comunes utilizadas por la acetilcolina al activar a los receptores muscarínicos.**

Los receptores muscarínicos pertenecen a la superfamilia de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Fig. 2). El acople de los receptores de las clases M1 y M2, es diferencial hacia las proteínas G de los tipos  $G_{q/11}$  y  $G_{i/o}$ , respectivamente, y está definido por la secuencia de aminoácidos de los dominios intracelulares  $i_2$  e  $i_3$  (Caulfield y Birdsall 1998). Esta activación de diferentes proteínas G para cada familia de receptores determina distintos mecanismos de señalización intracelular. Los receptores de la clase M1 se acoplan preferencialmente a la vía de la fosfolipasa C (PLC) (Fig. 2); mientras que los de la clase M2 pueden inhibir la vía de la AC o, mediante las proteínas G, actuar directamente sobre los canales de calcio de manera dependiente o independiente de voltaje (Caulfield y Birdsall 1998; Jones 1993). Sin embargo, ambos receptores pueden acoplarse a muchas otras vías de señalización intracelular, algunas de las cuales aparecen en la Tabla 2. En los últimos años el estudio de los mecanismos de señalización implicados en las acciones muscarínicas ha reforzado la idea de la multiplicidad de vías aunque las expuestas arriba son las más comunes o principales (Harvey y Belevych 2003, Lanzafame et al. 2003; Nathanson 2000). Es necesario puntualizar que hay mensajeros finales en diferentes puntos de la vía de señalización activada, por lo que aunque sea activada una misma vía, el mensajero y el efector final pueden ser diferentes.

### **2.7 Vía de la fosfolipasa C.**

La activación de los receptores muscarínicos de la familia M1 provoca el encendido de la vía de la fosfolipasa C en la mayoría de los casos (Fig. 2). Sin embargo, los receptores

Tabla 2. Mecanismo de transducción de señales de los distintos tipos de receptores muscarínicos

Vía	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
Hidrólisis de PI	+++	+	+++	+	+++
Inhibición de la AC	+	+++	-	+++	-
Estimulación del cAMP	+++	+	+++	-	+++
Estimulación de la PLC	+++	+	+++	+	+++
Estimulación de la PLA <sub>2</sub> con liberación de AA	+++	±	+++	±	+++
Estimulación de la PLD	+++	+	+++	+	+++
Incremento de Ca <sup>2+</sup>	+++	-	+++	-	+++

+++ : efectos fuertes; +: efectos débiles; ±: efectos débiles cuando se sobreexpresan. Adaptado de Wang et al. (2004)

de la familia M2 también pueden acoplarse a esta vía, aunque débilmente (Felder 1995, Yan y Surmeier 1996)

En la forma más común, la PLC<sub>β</sub> es estimulada por la subunidad G<sub>α</sub> de algún miembro de la familia de las proteínas G<sub>q</sub> (que incluye a las G<sub>αq</sub>, G<sub>α11</sub>, G<sub>α14</sub>, G<sub>α15</sub> and G<sub>α16</sub>) una vez que fue activada esta proteína por el receptor ocupado. A su vez, la PLC<sub>β</sub> cataliza la hidrólisis del fosfoinosítido fosfatidil inositol 4,5- bifosfato (PIP<sub>2</sub>) produciendo el inositol 1, 4, 5- trisfosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C.

Estos mensajeros (Ca<sup>2+</sup> y PKC), actuando sinérgicamente o por separado, pueden modificar la actividad de los canales iónicos, de los sistemas enzimáticos, y de las proteínas estructurales (Delmas et al. 2004).

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede activar a diferentes proteínas como la calmodulina (CaM), la adenilato ciclasa, a los mismos receptores de IP<sub>3</sub>, así como a varios tipos de PKC atípicas o típicas. La calmodulina a su vez puede activar a proteínas cinasas y fosfatasas como por ejemplo a las cinasa calmodulina II (CaMKII) y a la fosfatasa calcineurina (también conocida como PP-2B). La adenilato ciclasa puede activar a la proteína cinasa A (PKA) mediante la producción del AMPc.

La actividad de los canales de calcio depende del equilibrio entre las acciones de las distintas cinasas y fosfatas. Dentro de las cinasas que se activan por la vía de la PLC, parece ser la PKC la más involucrada en la mayoría de los casos en que se trata de la modulación de los canales de calcio.

### **2.7.1 Proteína cinasa C y canales de calcio.**

La proteína cinasa C es una cinasa de serina/treonina formada por una región N-terminal regulatoria, y una región C-terminal catalítica (Marx 2003; Newton 1995). Esta cinasa presenta cuatro dominios conservados (C1-C4), y cinco variables (V1-V5). Los dominios N-terminales (C1 y C2) son requeridos para la interacción con el diacilglicerol, los estéres del forbol, la fosfatidilserina (PS), y el  $\text{Ca}^{2+}$  indicando que las interacciones lípido- proteína participan en el direccionamiento de la PKC. En la región N-terminal regulatoria también se encuentra el sitio del pseudosustrato autoinhibitorio. En la región C-terminal catalítica se localizan el sitio de unión con ATP, así como el sitio de unión al sustrato.

En tejido de mamífero han sido identificadas 12 isoformas de la PKC que se agrupan en tres familias dependiendo de los cofactores que las activan (Marx 2003; Newton 1995). Estas son la familia de las isoformas clásicas, la de las nuevas, y la de las atípicas. Tanto las isoformas clásicas como las nuevas son activadas por el DAG y la PS, sin embargo,

las primeras necesitan al calcio para ser activadas mientras que las segundas no. Por su parte las isoformas atípicas sólo son reguladas por la fosfatidilserina.

Todos los tipos de canal de calcio pertenecientes a las diferentes familias (ver Tabla 1) son susceptibles de ser regulados por la PKC al tener múltiples sitios consenso de fosforilación para esta enzima (Caterall 2000). Desde los primeros trabajos donde se estudió la participación de la PKC se encontró que la activación de la misma puede inhibir, estimular, o tener efectos bifásicos sobre las corrientes de calcio (Lacerde et al. 1988; Rane y Dunlap 1986; Yan et al. 1997). Estos efectos dísimiles pueden presentarse para los diferentes tipos de corriente de calcio, esto es, no depende del tipo de canal de calcio que esté siendo modulado. Así, para los canales de calcio de la familia  $Ca_v1$  (L) se puede presentar estimulación (He et al. 2000; Xu et al. 2003); inhibición (Cheng et al. 1995; Satoh 1995) y efectos bifásicos (Boixel et al. 2000; Kelso et al. 1996). Lo mismo sucede para todos los miembros de la familia  $Ca_v2$  (N, P/Q y R) (Belmeguenai 2002; Kamatchi et al. 2003; Stea et al. 1995) y los de la familia  $Ca_v3$  (Park et al. 2003; Pemberton et al. 2000).

¿Por qué se obtienen diferentes efectos sobre las corrientes de calcio (ICa) al activarse la PKC? Varios son los aspectos que hay que considerar por parte de los dos actores: la PKC, y los canales de calcio. En cuanto a la primera, está la existencia de múltiples isoformas de PKC en las diferentes células; de varios receptores para la cinasa C activa y de proteínas que interaccionan con la PKC que pudieran influir en una activación y translocación diferentes aún existiendo las mismas isoformas; por último está la presencia de proteínas adaptadoras y de anclaje que pueden diversificar los efectos de la PKC. Con respecto a los canales de calcio, tenemos la existencia de diferentes subtipos de canal; variantes en las subunidades principales, y en las subunidades auxiliares.

Así por ejemplo, los estudios de Kamatchi y colaboradores (2003, 2004) muestran que dependiendo de los sitios de fosforilación presentes en el canal de calcio, este puede ser fosforilado por una u otra familia de isoformas de la PKC. Maeno- Hikichi y colaboradores (2003) encontraron una proteína, homóloga de enigma (ENH), que interacciona específicamente con la PKC $\epsilon$  y los canales de calcio de tipo N formando el complejo macromolecular PKC $\epsilon$ - ENH – canal de calcio tipo- N. La coexpresión de la ENH facilita la modulación de los canales de calcio tipo N por la PKC, mientras que la disrupción del complejo reduce la acción de la PKC. De esta forma, interactuando específicamente con la PKC y el canal de calcio, la ENH localiza a la PKC con su substrato específico.

### **2.7.2 Muscarina y fosforilación de los canales de calcio por la proteína cinasa C.**

Como era de esperarse, cuando los receptores muscarínicos activan a la PKC, también pueden producirse diferentes efectos sobre los canales de calcio. Se ha reportado tanto estimulación (Love et al. 1998; Sculptoreanu et al. 2001) como inhibición (Pemberton y Jones 1997; Pemberton et al. 2000; Sculptoreanu et al. 2001). En una línea celular de células  $\beta$ , la HIT-T15, el agonista muscarínico betanecol incrementa la I<sub>Ca</sub> unitaria y total a través del canal de calcio de tipo L (Love et al. 1998). Este efecto es mimetizado por un éster de forbol y un análogo permeable del DAG, mientras que el análogo inactivo del forbol no produce cambios. Sin embargo, en las células NIH 3T3, el receptor M<sub>1</sub> transfectado inhibe a los canales de calcio tipo L por la activación de la PKC (Pemberton y Jones 1997).

La activación de la PKC por los receptores muscarínicos puede producir acciones antagónicas en el ganglio pélvico mayor de la rata. La activación de la PKC por el receptor muscarínico M<sub>1</sub> produce la facilitación de los canales de calcio tipo L en una subpoblación de neuronas, mientras que en otras neuronas produce inhibición de la I<sub>Ca</sub>, aunque no se

determinó el subtipo de canal de calcio que está siendo modulado (Sculptoreanu et al. 2001).

En miocitos gástricos la activación de la PKC por los receptores muscarínicos  $M_5$  (aunque no se puede excluir alguna participación de los  $M_3$ ) produce un aumento de la corriente de calcio tipo L que es mimetizada por los esteres de forbol e inhibida por el péptido inhibidor de la PKC (Morita et al. 2002).

Los canales de calcio tipo- T también son modulados por la activación de la PKC al activarse los receptores muscarínicos de la familia  $M_1$  (Pemberton et al. 2000).

El sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus* ha sido usado para estudiar la participación de la PKC en la modulación de los canales  $Ca_v2.3$  usando como modelo la activación de esta cinasa por los receptores muscarínicos  $M_1$  (Kamatchi et al. 2001, 2003, 2004). En este sistema, la acetil- $\beta$ -metilcolina, produce un incremento en la I<sub>Ca</sub> que es bloqueado por el inhibidor específico de las PKC clásicas (PKC $\alpha$ ), el péptido  $\beta$ C2.4 y por bajas concentraciones del inhibidor Ro-31-8425 que también bloquea a estas isoformas (Kamatchi 2003). El hecho de que los efectos del agonista  $M_1$  sean abolidos por el inhibidor de la PLC, por el bloqueador del receptor de IP<sub>3</sub>, y por el quelante de  $Ca^{2+}$ , sugiere la participación de la PKC $\alpha$ .

Otro sistema que ha empleado como modelo la activación de los receptores muscarínicos  $M_1$  para estudiar la participación de la PKC en la modulación de los canales  $Ca_v2.3$ . es el de las células HEK293 (Melliti et al. 2000; Bannister et al. 2004). Este grupo de autores recientemente encontró que los receptores de la familia  $M_1$  ( $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$ ) potencian la actividad del canal  $Ca_v2.3$  a través de la PKC. Sin embargo, la PKC involucrada es una PKC nueva (PKC $\delta$ ) (Bannister et al. 2004). Es interesante notar que este resultado difiere del de Kamatchi (2003), en cuanto a la isoforma de la PKC que está siendo activada ya que estos autores encontraron que es una PKC $\alpha$ .

Por otra parte, aunque los receptores de la familia M2 no se acoplan preferencialmente a la vía de la PLC, Yan y colaboradores (1997) encontraron que en las interneuronas colinérgicas del neocórtex los receptores M<sub>2</sub> encienden la vía de la PLC, probablemente a través de subunidades G $\beta\gamma$ , lo que produce la activación de la PKC, y la inhibición del canal de calcio de tipo N.

El receptor M<sub>2</sub> también puede estimular la actividad de los canales Ca<sub>v</sub>1.2b acoplándose a la PKC en miocitos de la vena porta de conejo (Callaghan et al. 2004). En este caso se activan dos vías de señalización, una que involucra a una PKC $\alpha$ , y otra en la cual se activa una PKC $\eta$ . En la activación de la PKC $\eta$  no participa la vía de la PLC sino la PI3K, la cual es activada por las subunidades G $\beta\gamma$ .

## **2. 8 Vía de la adenilato ciclasa.**

Los receptores muscarínicos de la clase M2 (M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub>) son los que se acoplan preferencialmente a la vía de la AC. El acople ocurre a través de las proteínas G $\alpha_i$  y G $\alpha_o$  y produce la inhibición de la actividad de esta enzima con la consiguiente inhibición en la producción del AMPc (Caulfield y Birdsall 1998; Felder 1995). Varios reportes también señalan una estimulación de la actividad de AC mediada por los receptores de la clase M2 en el bulbo olfatorio de la rata y en líneas celulares (Caulfield y Birdsall 1998; Nathanson 1996). En el caso del bulbo olfatorio las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G $\alpha_o$  estimulan a las isoformas II y IV de la AC (Olianas et al. 1998). Por otra parte, en las líneas celulares, el incremento en la actividad de la AC se relaciona con un acople inespecífico debido a una alta expresión de los receptores (Nathanson 1996). Este mismo acople inespecífico ocurre cuando se expresan los receptores de la clase M1 en líneas celulares (Caulfield y Birdsall 1998, Nathanson 1996).



En miocitos cardíacos existen evidencias de que los receptores  $M_2$  pueden tener efectos estimulatorios e inhibitorios sobre la corriente de calcio dependiente de voltaje tipo L (Gómez et al. 2004; Harvey y Belevych 2003). En este sentido existe controversia acerca de si el efecto estimulatorio está mediado por el óxido nítrico o la activación de diferentes isoformas de la AC (Harvey y Belevych 2003). También en una línea celular obtenida de la pituitaria se ha reportado la estimulación de la corriente de calcio tipo L, en este caso a través de la inhibición de la AC, del AMPc, y de la PKA (Pemberton y Jones 1995).

En el neoestriado estudios bioquímicos señalan al receptor  $M_4$  como el responsable de la inhibición de la actividad adenilato ciclasa y de los niveles de AMPc al activarse los receptores muscarínicos (Olianas et al. 1996). En estos estudios el péptido MT- 3, antagonista específico de los receptores  $M_4$ , inhibió la actividad inhibitoria sobre la AC con una  $K_d = 4$  nM. Sin embargo, ninguno de los efectos muscarínicos sobre las diferentes conductancias de las NEMs parece estar mediado por esta vía.

## **2. 9 Modulación de los canales de calcio a través de la acción directa de las proteínas G.**

Aunque los receptores muscarínicos de la clase  $M_2$  pueden modular a los canales de calcio dependientes de voltaje a través de la vía de segundos mensajeros de la AC, las acciones directas de las proteínas  $G_{i/o}$  sobre estos canales es por mucho la más comúnmente encontrada. En este sentido, muchas neuronas que expresan receptores de la clase  $M_2$ , como por ejemplo, en las piramidales del hipocampo, las neuronas simpáticas, las neuronas sensoriales, las interneuronas neoestriatales, las neuronas parasimpáticas, y las piramidales de la corteza (Jones y Elmslie 1997; Beech et al. 1992; Shapiro et al. 1999; Diversé- Pierluissi et al. 1995; Cuevas y Adams 1997; Stewart et al.

1999) presentan modulación muscarínica directa y mediada por  $G_{i/o}$ . Por lo que este parece ser, hasta el momento, el mecanismo por excelencia para la modulación de canales de calcio por la activación de receptores de la clase M2. Además, no se ha encontrado evidencia de participación del AMPc o de la PKA; al menos en las neuronas estudiadas hasta el momento (Zhu y Yakel 1997; Toselli y Lux 1989; Allen y Brown 1993).

La acción directa de las proteínas  $G_{i/o}$  es rápida ( $< 1s$ ), muchas veces depende del voltaje, ya que se elimina con pulsos a voltajes muy despolarizados, y está mediada por el complejo  $\beta\gamma$  de la proteína actuando directamente sobre el canal (Delmas et al. 1998; Kammermeier et al. 2000). La unión  $\beta\gamma$  - canal inhibe la corriente de calcio. En algunos casos, sin embargo, la acción de  $G_{i/o}$  es independiente de voltaje. Según estudios recientes en neuronas simpáticas (Delmas et al. 1998), la acción estaría mediada por la subunidad  $\alpha_0$  de la proteína  $G_0$ . Más experimentos son necesarios para aclarar este punto. Es interesante mencionar que también los receptores muscarínicos de la clase M1, específicamente los  $M_{11}$ , podrían estar actuando de manera directa sobre el canal de calcio; según un trabajo reciente en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (Kammermeier et al. 2000).

## **2. 10 Vías alternas usadas por la acetilcolina al activar a los receptores muscarínicos.**

La acetilcolina a través de la activación de los receptores muscarínicos puede usar otras vías aparte de las llamadas vías "clásicas" (Tabla 2). Así, la activación de los receptores muscarínicos de la clase M1 puede producir la activación de la vía de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) con la producción de ácido araquidónico (AA), y la estimulación de la fosfolipasa D (PLD). La activación de los receptores de la clase M2 también pueden

acoplarse a la vía de la PLA<sub>2</sub> y la PLD, aunque con menos eficiencia, cuando se sobreexpresa en líneas celulares (Caulfield y Birdsall 1998; Felder et al. 1995).

Precisamente, el mensajero desconocido que media los efectos inhibitorios del receptor M<sub>1</sub> sobre las corrientes de calcio de tipo N en las neuronas simpáticas de ratas neonatas es el AA a través de la activación de la vía de la PLC y de la PLA<sub>2</sub> (Liu y Rittenhouse 2003).

Otras de las vías que pueden ser activadas es la de la tirosina cinasa (TK) (Callagan et al. 2004; Jin et al. 2002). Esta es una de las vías que produce la estimulación del canal de calcio Ca<sub>v</sub>1.2b por la activación del receptor M<sub>2</sub> en miocitos de la vena porta de conejo (Callaghan et al. 2004). En este caso la subunidad Gβγ de las proteínas G<sub>i</sub> activan a la PI3Kγ (cinasa de fosfoinositidos 3), la cual a su vez activa a una PKCn, y esta finalmente a la tirosina cinasa. Todavía no se conoce como es que la PI3Kγ activa a la PKCn, aunque se sabe que tiene actividad intrínseca de serina que podría llevar a la activación de la PKC. En el músculo liso los receptores M2 también provocan un aumento en la corriente de calcio tipo L a través de la activación de la TK (Jin et al. 2002).

Otras de las vías alternas que puede encender la acetilcolina al activar a los receptores muscarínicos es la de la guanilato ciclasa (GC). Se ha visto que la liberación del Ca<sup>2+</sup> a través de la vía de la PLC/IP3/ Ca<sup>2+</sup> puede activar a la calmodulina (CaM), la cual activa a la sintetasa del óxido nítrico produciendo óxido nítrico. El óxido nítrico activa a su vez a la GC obteniéndose el cGMP. También en algunas células se ha encontrado que el Ca<sup>2+</sup> puede activar directamente a la GC y producir cGMP (De Vente 2004). Esta vía pudiera ser la responsable de parte de la estimulación e inhibición del canal de calcio tipo L en células cardíacas (Harver y Belevych 2003). De hecho, en miocitos ventriculares parece ser que el cGMP, está activando a una fosfatasa para inhibir al canal de calcio de tipo L (Shen y Pappano 2002).

Como es fácil de concluir de los antecedentes, no es posible definir a priori cual es el receptor principal, y cual la cadena de señalización utilizada por este, para mediar los efectos colinérgicos en una neurona dada. Por lo que este trabajo de Tesis intentará avanzar en el conocimiento de estos mecanismos utilizando como modelo la neurona estriatal de proyección. Es en esta neurona donde residen los efectos muscarínicos que, empíricamente, son manipulados con fármacos bastante poco selectivos, durante la terapéutica de la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades motoras. Por lo tanto, el avance en este conocimiento tiene relevancia clínica y aplicada.

## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

3.1.1. Los receptores muscarínicos más importantes para la modulación de los canales de calcio de la familia  $Ca_v2$  en las neuronas estriatales de proyección son los  $M_1$ .

3.1.2. Cuando menos una parte de las acciones del receptor  $M_1$  sobre las corrientes de calcio de tipo  $Ca_v2$  se debe a la activación de la proteína cinasa C.

#### **3.2 Objetivos**

3.2.1. Determinar si el receptor muscarínico  $M_1$  modula las corrientes de calcio a través de los canales  $Ca_v2$  en las neuronas espinosas medianas del neostriado.

3.2.2. Definir él (los) subtipo (s) de canal de calcio  $Ca_v2$  modulados por el receptor muscarínico  $M_1$ .

3.2.3. Determinar si el receptor muscarínico  $M_4$  está involucrado en parte de la modulación de las corrientes de calcio a través de los canales  $Ca_v2$  en las neuronas espinosas medianas del neostriado.

3.2.4. Investigar la participación de la proteína cinasa C (PKC) en la modulación de los canales de calcio  $Ca_v2$  por el receptor muscarínico  $M_1$ .

## CAPÍTULO 4

### MATERIALES Y METODOS

#### 4. 1 Obtención de neuronas disociadas

Los experimentos se realizaron en neuronas neoestriatales obtenidas del cerebro de ratas Wistar (100 -120 g). Las ratas se sacrificaron por decapitación después de ser anestesiadas. Se obtuvo rápidamente el cerebro y se colocó en una solución salina fría (4° C) conteniendo (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucosa, 0.0002 tiourea y 0.0002 de ácido ascórbico (pH = 7.4; 298 mOsm/l, gasificada con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Se obtuvieron rebanadas parasagitales del neoestriado de 300-400 μm de grosor con un vibratomo (Ted Pella, Reading, CA). Las rebanadas obtenidas fueron incubadas en esta misma solución salina a temperatura ambiente (23-25 ° C), y se dejaron equilibrar por una hora. Cada disociación se realizó con cuatro rebanadas de las cuales se disectó la región dorsal del neoestriado en una solución amortiguada con HEPES (en mM): 136 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucosa (pH = 7.4; 300 mOsm/l con glucosa). A continuación se procedió a incubar el tejido estriatal en la misma solución de HEPES con 1- 1.5 mg/ml de pronasa E tipo XIV (Sigma, St Louis, MO) a 32 °C. Después de alrededor de 20 min, el tejido fue lavado con la misma solución de HEPES pero con bajo calcio (0.2 mM). En esta solución se realizó la disociación mecánica con pipetas Pasteur de diferentes diámetros (grueso, mediano y fino). El sobrenadante con las neuronas (2 ml), se sembró en una caja de Petri de 35 mm montada sobre la platina de un microscopio invertido, y con 1 ml de solución externa. La solución externa contenía (en mM): 136 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 BaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucosa, 0.001 TTX, (pH= 7.4, 300 mOsm con glucosa). Una vez que las células se asentaron se comenzó a perfundirlas con esta misma solución externa a una velocidad de 1 ml/min.

## 4.2 Registro electrofisiológico

Las corrientes de calcio de las neuronas de proyección (10- 12  $\mu\text{m}$  de diámetro somático, y capacitancia de entre 6 y 7 pF) se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje en célula entera (*"whole cell voltaje clamp"*). Las neuronas con valores de capacitancia mayores fueron descartadas ya que se sabe que sólo las que presentan capacitancias de entre 6 y 7 pF son las neuronas de proyección (Yan y Surmeier 1996). Los registros de las corrientes de calcio se realizaron usando las técnicas de registro estándar. Las pipetas para los registros se fabricaron de vidrio de borosilicato (WPI; Sarasota, FL) en un estirador de pipetas (Sutter Instrument Corp, Novato, CA), y fueron pulidas con calor antes de usarlas. La solución interna de registro contenía (en mM): 180 N-Metil D-Glucamina o NMDG, 4  $\text{MgCl}_2$ , 10 EGTA, 10 HEPES, 0.1 leupeptina, 2  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 0.4  $\text{Na}_2\text{GTP}$  (pH= 7.2 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 265-275 mOsM/l con glucosa). La resistencia (DC) de los electrodos fue de entre 3-7  $\text{M}\Omega$  en el baño. Los registros los obtuvimos usando un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments, Foster City, CA) controlado y monitoreado con el programa Pclamp (versión 5), a través de una computadora con una interfase DMA de 125 kHz (Axon Instruments). Después del rompimiento del sello entre la pipeta y la membrana celular se compensó la resistencia en serie ( $<15 \text{M}\Omega$ ) un 70 a 80 %, que se monitoreaba periódicamente antes y después de aplicarse cualquier fármaco. La capacitancia de la membrana también fue compensada y monitoreada. Las corrientes no excedieron los 500 pA por lo que los errores en el voltaje debido a una compensación inadecuada no excedieron unos pocos milivoltios. El control del voltaje se monitoreó después de la compensación examinando la reproducibilidad de los trazos y las colas de corriente. Las células en las cuales los trazos no fueron reproducibles, o con colas de corriente con decaimiento muy lento fueron descartadas. Las relaciones corriente- voltaje (I-V), antes y después del bloqueo con los fármacos, fueron realizadas tanto con las

respuestas en corriente a comandos de voltaje sucesivos de 10 mV desde -80 hasta + 50 mV, como con las respuestas a comandos de voltaje en forma de rampa (0.7 mV/ms) desde -80 a +50 mV. Como ambos métodos coinciden (ver artículo en Resultados: Figura 2B), solo se mostrarán las respuestas a las rampas de voltaje para mayor claridad. Los fármacos se aplicaron con un sistema que aprovechaba la gravedad a través de un capilar posicionado a  $\pm 200 \mu\text{m}$  de la célula. Los cambios de solución se realizaron a una velocidad de 0.5 ml/min usando un sistema de microválvulas (Lee CO, Essex, CT) controlado por voltaje. El curso temporal para evaluar los efectos de los distintos fármacos se construyó a partir de los valores de corriente al pico en respuesta a la rampa de voltaje. En varios experimentos también se aplicaron protocolos de doble comando rectangular para ver si parte de la inhibición era a través de una vía dependiente de voltaje y delimitada a membrana.

### **4.3 Fármacos utilizados.**

Los fármacos se disolvieron en la solución salina de perfusión a partir de soluciones madre preparadas cada día. Las concentraciones de los fármacos en equilibrio se alcanzaron en  $\pm 3$  s usando el sistema de perfusión impulsado por la gravedad. La muscarina, la nitrendipina, el forbol miristato acetato (PMA), y el péptido PKC 19- 36, se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Los ligandos muscarínicos como la toxina muscarínica 1 (MT- 1) y la toxina muscarínica 3 (MT- 3), se obtuvieron del proveedor Alomone (Jerusalem, Israel). La toxina muscarínica 7 (MT- 7) se obtuvo de Peptides International (Louisville, KY). La nomenclatura que usamos en el trabajo para estos fármacos es la que usan estos proveedores. Los antagonistas de los canales de calcio tales como la  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTx), la  $\omega$ -agatoxina TK ( $\omega$ -AgaTK), y la  $\omega$ -conotoxina MVIIC ( $\omega$ -CTx), se obtuvieron tanto de Peptides Internacional como de



Alomone. Los inhibidores de la PLC y de la PKC: el U-73122 y la bisindolmaleimida (BIS), respectivamente, se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA). Muchos fármacos se disolvieron en agua para preparar las soluciones madre, y posteriormente se adicionaron a la superfusión para alcanzar la concentración final. La nitrendipina, el PMA, y el U-73122 se disolvieron en dimetilsulfoxido.

#### **4.4 Análisis de los datos**

Los datos digitalizados fueron importados para ser analizados y graficados en el programa comercial Origin (Origin v. 6., Microcal, Northampton, MA). En todos los casos se reporta la media y el error estándar para los valores de I<sub>Ca</sub>. La significancia estadística de la diferencias de las muestras se evaluó usando pruebas estadísticas que son libres de la influencia de la distribución como la U de Mann-Whitney y la T de Wilcoxon usando el programa comercial Systat (Systat v.7.; SPSS, Chicago, IL). En algunos casos los resultados se ilustran utilizando gráficos de caja (*“box plots”* de Tukey 1977). En estos gráficos la línea horizontal en el medio de la caja representa la mediana de la muestra, la parte inferior y la superior representan los percentiles 25 y 75 respectivamente, mientras que los extremos de las barras muestran los percentiles 5 y 95, lo que quiere decir que con estas gráficas se puede evaluar, de un solo vistazo, como se comportó toda la muestra ante la manipulación experimental así como el nivel de variabilidad biológica en las respuestas.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Resultados I

En la primera parte del proyecto de tesis identificamos, usando agonistas selectivos y antagonistas específicos, que la inhibición de los canales de calcio de la familia  $Ca_v2$  en las neuronas neostriatales de proyección está principalmente mediada por la activación colinérgica de los receptores muscarínicos  $M_1$ . También encontramos, empleando bloqueadores específicos de los canales de calcio, que los canales que están siendo inhibidos por la activación del receptor  $M_1$  son: el  $Ca_v2.1$  y el  $Ca_v2.2$ . Estos resultados del proyecto son parte del artículo que aparece adjunto aceptado para su publicación en el *Journal of Neurophysiology*.

## Cholinergic Control of Firing Pattern and Neurotransmission in Rat Neostriatal Projection Neurons: Role of $Ca_v2.1$ and $Ca_v2.2$ $Ca^{2+}$ Channels

Tamara Perez-Rosello, Alejandra Figueroa, Humberto Salgado, Carmen Vilchis,\* Fatuel Tecuapetla, Jaime N. Guzman, Elvira Galarraga, and Jose Bargas

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City DF, Mexico

Submitted 17 August 2004; accepted in final form 15 December 2004

**Perez-Rosello, Tamara, Alejandra Figueroa, Humberto Salgado, Carmen Vilchis, Fatuel Tecuapetla, Jaime N. Guzman, Elvira Galarraga, and Jose Bargas.** Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of  $Ca_v2.1$  and  $Ca_v2.2$   $Ca^{2+}$  channels. *J Neurophysiol* 93: 000–000, 2005. First published December 22, 2004; doi:10.1152/jn.00853.2004. Besides a reduction of L-type  $Ca^{2+}$ -currents ( $Ca_v1$ ), muscarinic and the peptidic  $M_1$ -selective agonist, MT-1, reduced currents through  $Ca_v2.1$  (P/Q) and  $Ca_v2.2$  (N)  $Ca^{2+}$  channel types. This modulation was strongly blocked by the peptide MT-7, a specific muscarinic  $M_1$ -type receptor antagonist but not significantly reduced by the peptide MT-3, a specific muscarinic  $M_4$ -type receptor antagonist. Accordingly, MT-7, but not MT-3, blocked a muscarinic reduction of the afterhyperpolarizing potential (AHP) and decreased the GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) produced by axon collaterals that interconnect spiny neurons. Both these functions are known to be dependent on P/Q and N types  $Ca^{2+}$  channels. The action on the AHP had an important effect in increasing firing frequency. The action on the IPSCs was shown to be caused presynaptically as it coursed with an increase in the paired-pulse ratio. These results show: first, that muscarinic  $M_1$ -type receptor activation is the main cholinergic mechanism that modulates  $Ca^{2+}$  entry through voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in spiny neurons. Second, this muscarinic modulation produces a *postsynaptic facilitation* of discharge together with a *presynaptic inhibition* of the GABAergic control mediated by axon collaterals. Together, both effects would tend to recruit more spiny neurons for the same task.

### INTRODUCTION

Striatal acetylcholine (ACh) comes from intrinsic cholinergic interneurons (Bolam et al. 1984) and the neostriatum is a nucleus with one of the highest concentrations of both ACh and cholinergic receptors in the brain (Vilario et al. 1991; Volpicelli and Levey 2004). ACh mediates important postsynaptic and presynaptic effects in the neostriatum (Calabresi et al. 2000; Zhou et al. 2003) and anticholinergic agents are important supplementary drugs for Parkinson's disease therapeutics, intended to restore a supposed imbalance between the dopaminergic and the cholinergic systems (Zhou et al. 2003).

Striatal spiny neurons originate the output pathway of the neostriatum to other basal ganglia nuclei. These spiny neurons predominantly express 2 types of muscarinic receptors:  $M_1$  and  $M_4$  (Bernard et al. 1992; Hersch and Levey 1995; Yan et al. 2001).  $M_1$ -type receptors belong to the  $M_1$ -class, which is preferentially coupled to the hydrolysis of phosphatidylinosi-

tol. Instead,  $M_4$ -type receptors belong to the  $M_2$ -class, whose activation reduces adenylate cyclase activity or inhibits voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels (Caulfield and Birdsall 1998; Jones 1993). In many neurons,  $M_2$ -class receptors, including the  $M_4$  subtype, regulate N- and/or P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels through fast membrane-delimited pathways (Allen and Brown 1993; Bernheim et al. 1992; Cuevas and Adams 1997; Liu and Rittenhouse 2003; Murai et al. 1998; Shapiro et al. 1999; Yan and Surmeier 1996; Wanke et al. 1994). However, the activation of  $M_1$ -class receptors may also regulate N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels through slow and diffusible signaling cascades (Bernheim et al. 1992; Liu and Rittenhouse 2003; Melliti et al. 2001; Shapiro et al. 1999). This work attempts to answer which of these mechanisms is the most important to regulate  $Ca^{2+}$  influx through voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in neostriatal projection neurons. To answer this question we used the most selective antagonists of the muscarinic receptors known to date: MT-3 and MT-7 (Karlsson et al. 2000; Potter et al. 2004).

It is of crucial importance to know which class of muscarinic receptor regulates  $Ca^{2+}$  entry through N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels in neostriatal projection neurons because these  $Ca^{2+}$  channels control vital cellular functions. For example,  $Ca^{2+}$  entry through N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels generate the afterhyperpolarizing potential (AHP) that makes up the interspike interval. In turn, the AHP regulates a basic neuronal function: the frequency response to a given stimulus, i.e., the input/output, or gain, function (Bargas et al. 1999; Perez-García et al. 2003; Pineda et al. 1992, 1995; Vilchis et al. 2000). In addition, N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels are responsible for triggering neurotransmitter release in most central synapses including those in the neostriatum (Catterall 1998; Momiyama and Koga 2001; Murakami et al. 2002; Reuter 1996; Rhee et al. 1999; Tecuapetla et al. 2004; Wheeler et al. 1994). Therefore there is a possibility that muscarinic actions have a global action on spiny cells performance arising from modulation of N- and P/Q-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. This work was previously reported in abstract form (Perez-Rosello et al. 2000, 2003).

### METHODS

#### Preparation of slices

Briefly, and as described elsewhere (Bargas et al. 1999), male adult Wistar rats (100–120 g) were used to record from acutely dissociated cells. Rats from our animal house were anesthetized and their brains

\* Deceased August 21, 2004.

AQ: A Address for reprint requests and other correspondence: J. Bargas, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box 70-253, Mexico City DF 04510, Mexico (E-mail: jbargas@ifc.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

AQ: A

quickly removed into ice-cold saline (4°C) containing (in mM): 123 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, and 11 glucose (pH 7.4 with NaOH, 298 mOsm/L with glucose; aerated with 95% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>). Parasagittal neostriatal slices (300 μm thick) were cut in 4°C saline using a vibratome (Ted Pella, Reading, CA). Slices were then transferred to room-temperature saline (23–25°C) and allowed to recover for 1 h.

#### Voltage-clamp recordings in dissociated cells

Neostriatal neurons were acutely dissociated using procedures similar to those previously described (Bargas et al. 1994, 1999; Vilchis et al. 2002). Briefly, slices were taken into a HEPES-buffered saline and the dorsal striatum was dissected. Striata were then placed in the same HEPES solution, now containing 1–1.5 mg/ml of pronase E-type XIV (Sigma, St. Louis, MO) at 32°C. After about 20 min, the tissue was removed into a low-Ca<sup>2+</sup> HEPES saline. It was then rinsed and cells mechanically dissociated with Pasteur pipettes. The cell suspension (2 ml) was plated in a 35-mm petri dish mounted on the stage of an inverted microscope containing 1 ml of the recording saline (in mM): 0.001 tetrodotoxin (TTX), 140 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4 with NaOH; 298 mOsm/L with glucose). Note that TTX blocked inward sodium currents and the charge carrier (through calcium channels) Ba<sup>2+</sup> is also a potent and unspecific K<sup>+</sup>-channel blocker. In addition, the intracellular solution did not contain K<sup>+</sup> ions. This made us confident that the recorded inward current was mainly carried by Ba<sup>2+</sup> ions passing through Ca<sup>2+</sup> channels (Bargas et al. 1994). Further, the inward current isolated in this way was totally blocked by 400 μM Cd<sup>2+</sup> (not shown) and as shown in the RESULTS, partially blocked by several known peptides known as specific Ca<sup>2+</sup> current blockers.

After allowing the cells to settle, superfusion began at about 1 ml/min with saline of the same composition. Recordings were made only from medium-sized neurons (10–12 μm of soma diameter and about 6–7 pF of whole cell capacitance) that had only a few short (<50 μm) proximal dendrites. Recordings of whole cell currents used standard techniques: Electrodes were pulled from borosilicate glass (WPI, Sarasota, FL) in a Flaming–Brown puller (Sutter Instrument, Novato, CA) and fire polished before use. The internal saline contained (in mM): 180 N-methyl-D-glucamine (NMG), 40 HEPES, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 2 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>3</sub>GTP, and 0.1 leupeptin (pH = 7.2 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 265–270 mOsm/L). Electrode DC resistances were 3–7 MΩ in the bath. Recordings were obtained with an Axopatch-1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), and controlled and monitored with a PC clone running pClamp (version 5) with a 125-kHz DMA interface (Axon Instruments). After seal rupture, the series resistance (<15 MΩ) was compensated (70–80%) and monitored before and after drug application. Voltage control was assessed after compensation by examining the tail currents generated by strong depolarizations. Current–voltage relationships before and during drug blockade were evoked with both 20-ms voltage commands from –80 to 50 mV in 10-mV steps and with current responses to voltage ramps (0.7 mV/ms) from –80 to 50 mV. Because results from both methods coincided (Fig. 2), for the sake of clarity most figures illustrate only ramp responses. Drugs were applied with a gravity-fed system that positioned a glass capillary 200 μm from the recorded cell in the direction of flow superfusion. Solution changes were performed with a DC-controlled microvalve system (Lee, Essex, CT).

#### Intracellular recordings

Slices obtained as above (see *Preparation of slices*), but sometimes from older animals (100–200 g), were also recorded in a submerged chamber and superfused with the same saline at 1 ml/min (34–36°C). Intracellular recordings were performed with microelectrodes filled with 3 M K-acetate (DC resistances: 80–120 MΩ) and the help of an

active bridge electrometer (Neuro Data, Cygnus Technologies, DWG format, Philadelphia, PA) (Pineda et al. 1992). Records were digitized and saved on VHS tapes (40 kHz) and analyzed off-line in a PC clone. Stimulation consisted of intracellular injections of constant-current steps to evoke either the AHP after a single action potential (Pineda et al. 1992) or repetitive firing. Stimuli were of suprathreshold intensity and given at a holding potential of –55 to –60 mV by adjusting constant current. Bridge balance as well as recovery periods (without DC current) were monitored between sample records. After recording some neurons were injected with biocytin as previously described (Galarraga et al. 1999). All neurons identified in the present study were medium-sized spiny projection neurons.

#### Voltage-clamp recordings of inhibitory postsynaptic currents (IPSCs)

In this case, neostriatal slices from PD14 rats were transferred to a custom Plexiglas recording chamber and superfused with oxygenated saline (3–6 ml/min) as above. Individual neurons were visualized (×40 water-immersion objective) under differential interference contrast (DIC) enhanced visual guidance using infrared videomicroscopy in an upright microscope (Diaphot, Nikon, Melville, NY) adapted with a CCD camera (CCD-100, Dage-MTI, Michigan City, IN). Synaptic events were evoked with a bipolar concentric tungsten electrode (12 μm at the tip; FHC, Bowdoinham, ME) located at the globus pallidus (GP) to stimulate antidromically the axons of spiny cells (Guzman et al. 2003). Paired shock stimulation (45–50 ms of interstimulus interval; 0.2- to 0.4-ms duration; 1–4 V; at a frequency of 0.1 Hz) was delivered with a computer interface (see following text). Isolation units (Digitimer, Hertfordshire, UK) between the computer and the stimulating electrodes were used to adjust stimulus parameters during the experiment. The distance between recording and stimulating electrodes was about 1 mm. Synaptic responses in these conditions were of moderate amplitude and had amplitude variation, but without exhibiting failures in most cases. Traces shown are the average of approximately 2-min recordings (10 traces) taken once the amplitude had been stabilized in a given condition. A hyperpolarizing voltage command (15 mV) continuously monitored input conductance. Internal solution was (in mM): 72 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>3</sub>GTP, 5 QX 314 (to prevent neuronal firing and enhance input resistance), and 0.5% biocytin (pH = 7.2, 275 mOsm/L). The bath solution contained 6-cyano-7-nitroquino-2,3-dione (CNQX) and D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) to block glutamatergic currents. Cells with resting potential more negative than –70 mV (at zero current), input resistance >200 MΩ, and holding current (in voltage-clamp mode) ≤0.02 nA to maintain a holding potential near the resting potential of the cell, were chosen. Whole cell recordings were made using a Axoclamp 2B/2A amplifiers (Axon Instruments). Whole cell access resistances were in the range 5–20 MΩ. Access resistance was continuously monitored and experiments abandoned if changes >20% were encountered. No cell capacitance, series resistance, or liquid junction potential (2 mV) compensations were made. All recordings were filtered at 1–3 kHz and digitized with an AT-MIO-6040E, a DAQ (NI-DAQ) board (National Instruments, Austin, TX) and a PC clone. Online data acquisition used custom programs made in the LabVIEW environment (National Instruments). The NI-DAQ board was used to save the data on binary files in the computer hard disk for further off-line analysis.

Drugs were dissolved in the bath saline from stock solutions made daily using a gravity-driven superfusion system. AP5, CNQX, muscarine, nitrendipine, QX-314, and TTX were all purchased from Sigma (St. Louis, MO). Muscarinic ligands were: muscarine (RBI, Natick, MA), the muscarinic peptides muscarinic toxin 1 (MT-1) and muscarinic toxin 3 (MT-3) from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), and muscarinic toxin 7 (MT-7) from Peptides International (Louisville, KY). Nomenclature chosen to name these peptides in the present

work follows that of commercial suppliers. Calcium channel antagonists:  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CgTx),  $\omega$ -agatoxin TK ( $\omega$ -AgaTK), and  $\omega$ -conotoxin MVIIC ( $\omega$ -CTX) were obtained from both Peptides International and Alomone Labs. Most drugs were dissolved in water to obtain stock solutions and added to the superfusate to give the final concentration. Nitrendipine was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, 0.1%).

Data analysis

Digitized data were imported for analysis and graphing into commercial software (Origin v. 6. Microcal, Northampton, MA). Means  $\pm$  SE of all ICa<sup>2+</sup>s, AHPs, and IPSCs are reported. However, free-distribution statistical tests were used to assess statistical significance of the differences between samples: Mann-Whitney *U* test or Wilcoxon's *t*-test.

RESULTS

Activation of muscarinic M<sub>1</sub>-type receptors reduces Ca<sup>2+</sup> currents through both N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in neostriatal neurons

F1 Figure 1A (filled circles) illustrates the time course of action of the cholinergic muscarinic agonist, muscarine (1  $\mu$ M), on whole cell Ca<sup>2+</sup> currents recorded from neostriatal medium-sized neurons (Ba<sup>2+</sup> is the charge carrier). Note that muscarine actions are reversible (Fig. 1A, filled circles and representative traces in Fig. 1B). Ca<sup>2+</sup> currents from another neuron (Fig. 1A, open circles) were recorded without adding any drug to appreciate the typical rundown in these experiments: 4  $\pm$  0.4% after 15-min recording (Fig. 1C, box plot; *n* = 35).

F2 Figure 2A (control) shows a family of currents evoked with depolarizing voltage commands in control conditions (Fig. 2A, bottom; see METHODS for an explanation of details of the voltage protocol). Figure 2A (muscarine) illustrates a family of currents recorded in the same cell after the addition of muscarine (1  $\mu$ M). Muscarine reduced both Ca<sup>2+</sup> currents and their slow tail currents for equivalent voltages (vg., 40 mV) (Fig. 2A, inset). Figure 2B shows Ca<sup>2+</sup> currents evoked in the same neuron, but this time with a depolarizing ramp command from -80 to 50 mV (indicated at the top; see METHODS). Ramp-evoked currents in the presence of muscarine were smaller than those evoked in

control conditions. Figure 2C shows the current-voltage relationships (*I-V* plots) obtained from experiments depicted in Fig. 2, A and B. Open (control) and filled (muscarine) circles are measurements from the currents in Fig. 2A (at the arrows), whereas continuous lines are taken from currents illustrated in Fig. 2B, plotted as a function of ramp voltage. Note that ramp-evoked *I-V* plots can be seen as the "fit" of *I-V* plots obtained with step commands. Thus the next figures will show *I-V* plots obtained with ramp commands only. However, most experiments were done with both protocols.

Figure 2D illustrates the time course of action of the selective muscarinic M<sub>1</sub> receptor agonist, the MT-1 peptide (48 nM) (Jerusalinsky and Harvey 1994), on Ca<sup>2+</sup> current amplitude. The *I-V* plot in Fig. 2E shows that MT-1 mimics the action of muscarine on Ca<sup>2+</sup> currents. Muscarine (1  $\mu$ M) reduced Ca<sup>2+</sup> currents 45  $\pm$  3% (Fig. 1B; *n* = 9; *P* < 0.01, Wilcoxon's *t*-test). Larger muscarine concentrations (5-10  $\mu$ M) did not produce additional blockade (not shown). MT-1 (48 nM) reduced these currents 42  $\pm$  6% (Fig. 2E; *n* = 7; *P* < 0.03, Wilcoxon's *t*-test). There were no significant differences between the effects of both agonists (Fig. 1F; Mann-Whitney *U* test). The concentration of MT-1 used is larger than the affinity constant obtained by displacing pirenzepine from brain synaptosomal membranes (19 nM; Jerusalinsky et al. 1992), but below the concentration that affects M<sub>4</sub> receptors working as an antagonist (Jerusalinsky and Harvey 1994; Kornisiuk et al. 2001). In addition muscarine had no further effect after this MT-1 concentration and larger concentrations of MT-1 had only minimal effects in one out of 3 tested cells (not shown). MT-1 action, at these concentrations, then supports the view that most muscarinic actions on Ca<sup>2+</sup> currents (Ca<sub>v</sub>1 and Ca<sub>v</sub>2) are by the activation of M<sub>1</sub>-type receptors in spiny neurons.

To further test this view, we first isolated the Ca<sup>2+</sup> current components that are not L-type by using saturating concentrations of a dihydropyridine blocker, nitrendipine (10  $\mu$ M) (Bargas et al. 1994), to block L-type Ca<sup>2+</sup> channels present in spiny cells (Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3; Olson et al. 2001). Thereafter, we intended to quantify how much muscarinic modulation remained. It was seen that muscarinic modulation (1  $\mu$ M mus-

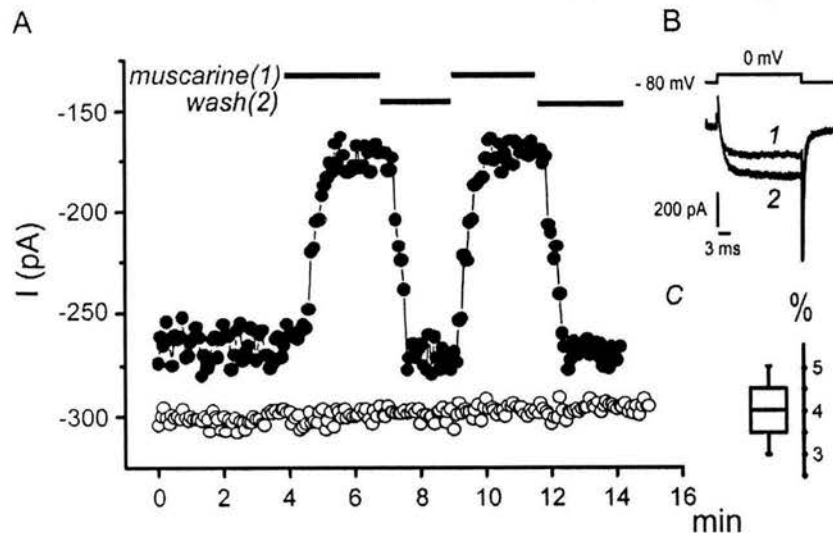


FIG. 1. Muscarine reversible decreases Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal neurons. A: time course of muscarine (1  $\mu$ M) action on Ca<sup>2+</sup> currents. Inward current depression is reversible (filled circles). Ca<sup>2+</sup> currents from another neuron (open circles) were recorded without adding any drug to appreciate the typical run down during the course of these experiments. B: representative traces from the experiment in A (filled circles) are shown. Voltage commands to 0 mV or ramp commands (see Fig. 2) from a holding potential of -80 mV were commonly used to test drug actions. Numbers relate these traces with the time course in A. C: box plot illustrates the percentage of current run down for a sample (*n* = 35) of neurons.

F3

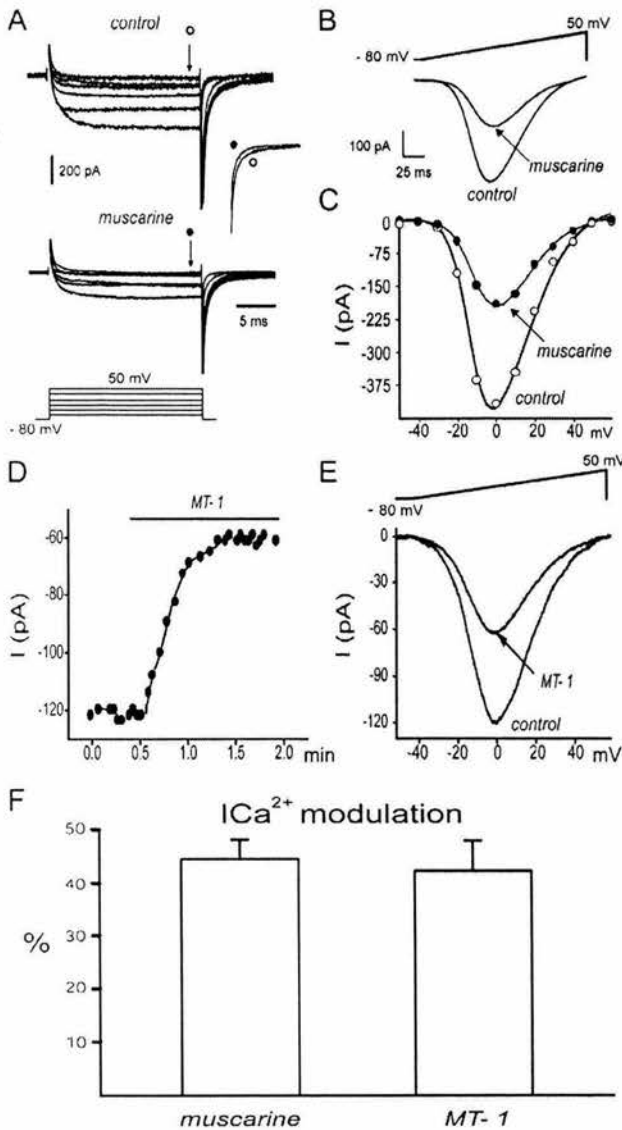


FIG. 2. Selective  $M_1$ -type muscarinic receptor agonist, the MT-1 peptide, mimics muscarine modulation of  $Ca^{2+}$  currents in neostriatal neurons. *A*: representative traces of isolated inward currents in response to 20-ms depolarizing voltage commands (bottom) from  $-80$  to  $50$  mV in  $10$ -mV steps, first in the absence (control) and then in the presence of  $1 \mu M$  muscarine ( $Ba^{2+}$  ( $5$  mM) was used as charge carrier in all experiments. Note a decrease in current amplitude during muscarine. Only 6 traces are shown for clarity. Inset shows a decrease in the slower component of the tail current for the  $40$ -mV command. *B*: in the same neuron,  $Ca^{2+}$  currents were also evoked with a  $180$ -ms ramp command (top) of  $0.7$  mV/ms depolarizing rate. Representative traces in control conditions and during muscarine are shown (bottom). Note a decrease in current amplitude during muscarine. *C*:  $I$ - $V$  plots were constructed measuring first, inward currents evoked by step commands (arrows in *A*) and graphed with symbols (empty and filled circles), and second, with ramp-evoked currents (continuous lines). Note that  $I$ - $V$  plots built from ramp responses seem as the "fit" of the measurements taken from step commands. For clarity, the next figures show only currents evoked with ramps. *D*: time course of the action of  $48$  nM MT-1, a selective muscarinic  $M_1$ -type receptor agonist, on  $Ca^{2+}$  currents. *E*: ramp-evoked currents before and during MT-1. Note similarity with muscarine. *F*: differences between percentage modulation by muscarine or MT-1 were nonsignificant.

carine), when L-type  $Ca^{2+}$  current was blocked, reduced the remaining current by  $29 \pm 1\%$  (Fig. 3A;  $n = 14$ ;  $P < 0.001$ , Wilcoxon's  $t$ -test). That is, nitrendipine only partially occluded muscarinic action (time course in Fig. 3B) and a substantial modulation remained in most cells (box plot in inset of Fig. 3B shows variability). Modulation with nitrendipine was significantly different from that obtained without nitrendipine ( $29$  vs.  $45\%$ ; see above;  $P < 0.001$ , Mann-Whitney  $U$  test). It is known that L-type  $Ca^{2+}$  channels are a main target for muscarinic modulation (Howe and Surmeier 1995). Noticeably, because nitrendipine reduces  $Ca^{2+}$  currents by about  $23 \pm 2\%$  ( $n = 15$ ,  $P < 0.002$ , Wilcoxon's  $t$ -test) (e.g., Vargas et al. 1994), and the experiments showed that blockage of L-channels occluded muscarinic modulation by about  $36\%$ , then, the result requires that modulation by muscarine be about  $69\%$  of available L-type  $Ca^{2+}$  current (Howe and Surmeier 1995). It is not known what is being targeted by the remaining modulation and which is the receptor involved. Thus we added other specific channel blockers together with nitrendipine: either  $\omega$ -CgTx, which blocks N-type channels, or  $\omega$ -AgaTK, which blocks P/Q-type channels (see METHODS and Vargas et al. 1994), the rationale being that, if one of these channels is targeted, its blockage would further occlude muscarinic actions.

Figure 3, C and D show that in the presence of both nitrendipine ( $10 \mu M$ ) and  $\omega$ -CgTx ( $1 \mu M$ ) (that is without L- and N-type  $Ca^{2+}$  channels), muscarinic actions were further occluded. Muscarine was now able to reduce the remaining current by only  $15 \pm 2\%$  (from  $29$  to  $15\%$ ;  $n = 8$ ;  $P < 0.001$ , Mann-Whitney  $U$  test). This suggested that N-type  $Ca^{2+}$  channels are also a target for muscarinic modulation. By itself,  $\omega$ -CgTx blocks about  $22 \pm 2\%$  ( $n = 12$ ) of the whole cell  $Ca^{2+}$  current (see following text and Vargas et al. 1994).

Similar experiments were performed in the presence of both nitrendipine ( $10 \mu M$ ) and  $\omega$ -AgaTK ( $400$  nM), a specific P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel blocker. Again, further occlusion of muscarinic modulation was found, current reduction now being only  $11 \pm 1\%$  (from  $29$  to  $11\%$ ;  $n = 5$ ;  $P < 0.004$ , Mann-Whitney  $U$  test). This result suggested that P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels are a third target for muscarinic actions (Fig. 3, E and F). By itself,  $\omega$ -AgaTK blocked about  $30 \pm 3\%$  of the  $Ca^{2+}$  current, being the most abundant  $Ca^{2+}$  current component (Vargas et al. 1994; Vilchis et al. 2002). In addition, 3 experiments were done with the 3  $Ca^{2+}$  channel blockers administered together: nitrendipine ( $10 \mu M$ ),  $\omega$ -CgTx ( $1 \mu M$ ), and  $\omega$ -AgaTK ( $400$  nM). In these experiments muscarine ( $1 \mu M$ ) had no further effect whatsoever (data not shown). Therefore to explain the actions of muscarine with and without the different combinations of  $Ca^{2+}$  blockers, the  $45\%$  reduction ascribed to muscarinic modulation was distributed in the following way by solving a linear system of equations (see Vilchis et al. 2002):  $45 = L(0.7) + P/Q(0.23) + N(0.27) + R$ , where L, P/Q, N, and R denote the percentage that each channel type contributes to the whole cell  $Ca^{2+}$  current (approximately):  $23 + 30 + 22 = 75\%$ , R-channels being about  $20$ - $25\%$  (see above). These results then pointed to the following conclusions: first, they confirmed that L-type channels are preferentially targeted by muscarine (nearly  $70\%$  block) (Howe and Surmeier 1995) and, second, they also showed that an important part of the remaining modulation ( $50\%$ ) was shared by other channel types:  $23\%$  of P/Q and  $27\%$  of N. Bottom graph in Fig. 3G summarizes these data. To conclude, the experiments sug-

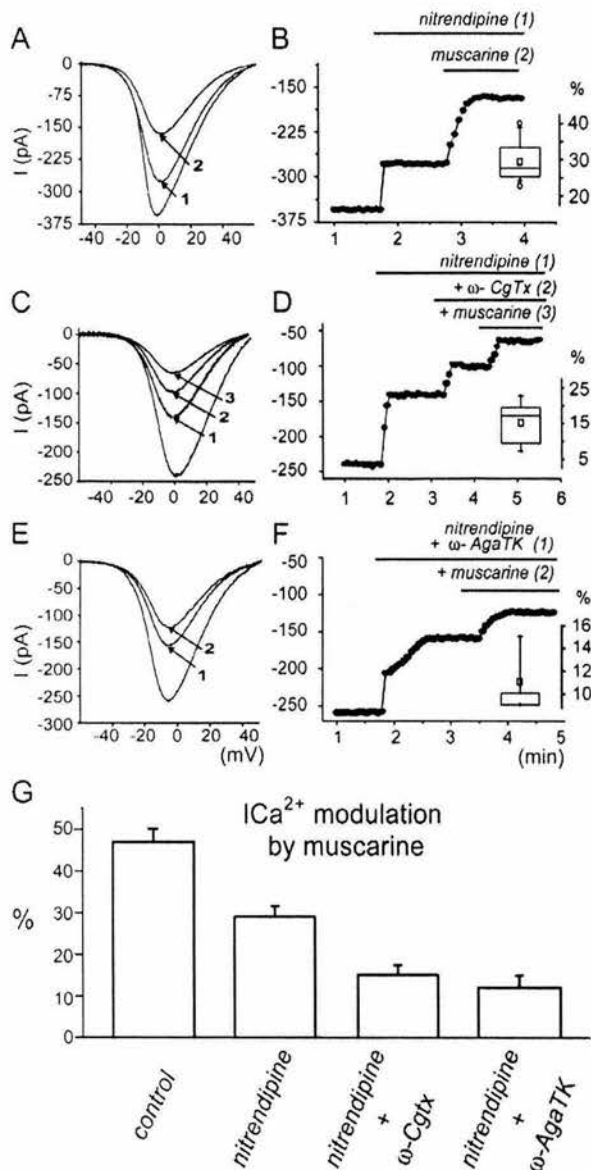


FIG. 3. Besides Ca<sub>v</sub>1 (L-type) Ca<sup>2+</sup> channels muscarinic actions also target Ca<sub>v</sub>2.1 (P/Q-type) and Ca<sub>v</sub>2.2 (N-type) Ca<sup>2+</sup> channels. *A*: representative traces showing substantial muscarinic modulation of Ca<sup>2+</sup> currents (1 μM muscarine) after nitrendipine (10 μM). Nitrendipine blocks most L-type Ca<sup>2+</sup> channels at this holding potential. *B*: time course of muscarinic actions after nitrendipine blockage of L-type currents. Muscarine reduced the remaining current ("non-L" or Ca<sub>v</sub>2). In this pair of frames (*A*, *B*) and in those below, numbers besides treatments at right (*B*) correspond to representative records at left (*A*). Box plots at the insets in this and all experiments illustrate distribution of effects in experimental samples. *C* and *D*: ω-conotoxin GVIA (ω-CgTx; 1 μM), a specific blocker of N-type Ca<sup>2+</sup> channels at this concentration, partially occluded muscarinic actions. *E* and *F*: ω-agatoxin TK (ω-AgaTK; 400 nM), a specific blocker of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels at this concentration, partially occluded muscarinic actions, too. *G*: a summary of % modulation by muscarine in the presence of different Ca<sup>2+</sup> channel blockers.

gested that the activation of muscarinic receptors was targeting 3 types of Ca<sup>2+</sup> channel: L, N, and P/Q.

Next we wanted to see which receptor modulates N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels because it is known that L-type Ca<sup>2+</sup>

channels are controlled by the M<sub>1</sub>-type receptor (Howe and Surmeier 1995). Figure 4*A* illustrates that a substantial amount of muscarinic modulation remained in the presence of MT-3 (10–20 nM), a specific antagonist of muscarinic M<sub>4</sub>-type receptors (Caulfield and Birdsall 1998; Potter et al. 2004). With the block of both M<sub>4</sub>-type receptors and L-type Ca<sup>2+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> currents were reduced by 23 ± 4% (*n* = 19, range: 12–38%), which is not significantly different from the reduction without MT-3 (29%; see above). In contrast, muscarinic modulation was substantially reduced in the presence of MT-7 (10–30 nM), a specific antagonist of muscarinic M<sub>1</sub>-type receptors (Caulfield and Birdsall 1998; Karlsson et al. 2000) (Fig. 4*B*). The remaining muscarinic modulation after MT-7 was 9 ± 1% (*P* < 0.005, Mann–Whitney *U* test). Cell-to-cell variability is illustrated in the box plot of Fig. 3 (*inset*). The histogram at the bottom (Fig. 4*C*) summarizes these experiments, which do not discard a slight modulation by M<sub>4</sub>-type receptors but clearly suggest that M<sub>1</sub>-type receptor activation

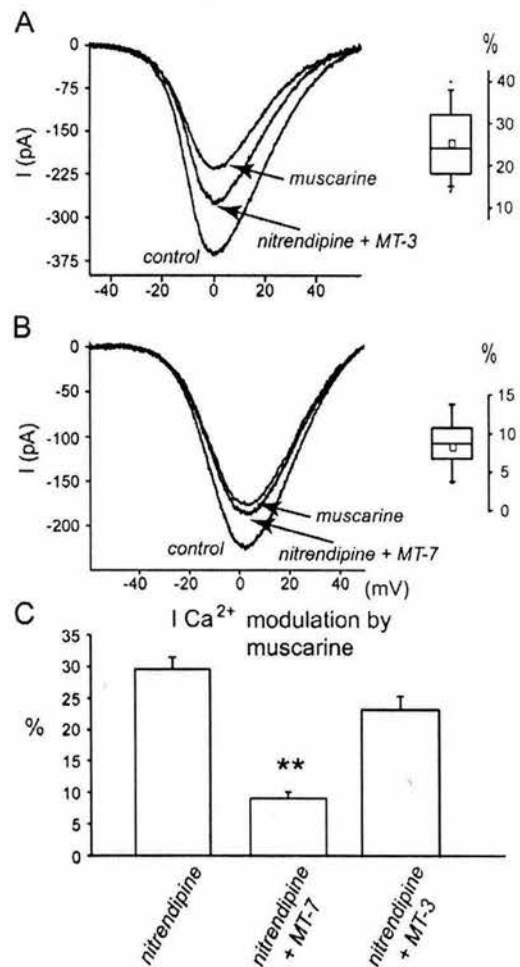


FIG. 4. Muscarinic actions on Ca<sup>2+</sup> currents are mainly mediated by the activation of M<sub>1</sub>-type receptors. *A*: in the presence of the specific M<sub>4</sub>-type receptor antagonist, the peptide MT-3 (20 nM), muscarine still reduced Ca<sup>2+</sup> currents unblocked by nitrendipine. *B*: in the presence of the specific M<sub>1</sub>-type receptor antagonist, the peptide MT-7 (10 nM), muscarine could not block most Ca<sup>2+</sup> currents unblocked by nitrendipine. *C*: histogram shows that muscarinic actions were significantly blocked only after MT-7.

mediates most muscarinic actions on N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  currents.

F5 The above conclusion was further confirmed by the use of the selective  $M_1$ -type receptor agonist MT-1 (48 nM). Figure 5 compares the action of the MT-1 peptide (48 nM) in the presence of L-type  $Ca^{2+}$  current blockage, first in the absence (top) and then in the presence (middle) of the MT-3 peptide (20 nM). Modulation was not significantly different:  $20 \pm 2\%$  ( $n = 8$ ; Fig. 5A) and  $25 \pm 4\%$  ( $n = 6$ ; Fig. 5B;  $P > 0.2$ , Mann-Whitney  $U$  test), indicating that  $M_4$ -receptor block does not appreciably influence muscarinic effects. A histogram (Fig. 5C) summarizes these results. In contrast, MT-7, the specific  $M_1$ -type receptor antagonist, reduced MT-1 action to  $8 \pm 0.2\%$  ( $n = 3$ ; data not shown).

However, it could still be argued that the action of  $M_4$ -type receptor activation is hard to see because, in some cells, it is concentrated only on one type of  $Ca^{2+}$  channel, and that only when both  $M_4$ -type receptors and a given  $Ca^{2+}$  channel are both blocked, an important reduction in muscarine actions could be seen. Thus muscarine was tested with the following blockers administered together: 1) the specific  $M_4$ -type receptor antagonist MT-3 (20 nM) ( $M_4$ -type receptors blocked), 2)

nitrendipine to block L-type channels (L-type  $Ca^{2+}$  channels blocked), and 3) either N- or P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel antagonists (N- or P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels blocked). In these conditions, the experiments showed the same magnitude of muscarine effects. That is, blockage of  $M_4$ -type receptors did not alter muscarinic actions on any one of the channels, N or P/Q, as illustrated in Fig. 6:  $23 \pm 4\%$  block in  $10 \mu M$  nitrendipine (Fig. 6A;  $n = 19$ ;  $P > 0.19$ );  $14 \pm 2\%$  in nitrendipine plus  $1 \mu M$   $\omega$ -CgTx (Fig. 6B,  $n = 7$ ;  $P > 0.4$ ); and  $13 \pm 2\%$  in nitrendipine plus  $400$  nM  $\omega$ -AgaTK (Fig. 6C;  $n = 11$ ;  $P > 0.8$ ). No mean result was significantly different from the equivalent value obtained with available  $M_4$  receptors (Mann-Whitney  $U$  test). To summarize, all data obtained with the use of specific muscarinic receptor antagonists indicated that, besides modulating L-type  $Ca^{2+}$  channels,  $M_1$ -type receptors are also in charge of modulating N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels. Given the variability of the responses, the action of  $M_4$ -type receptor activation could not be completely ruled out, although it is expected to be slight, at best.

Impact of N-P/Q-channel modulation on neuronal firing

Although both N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels cooperate to produce the  $Ca^{2+}$  influx that activates the AHP in spiny neurons (Vilchis et al. 2000), it has been found that both channel types have to be inhibited at the same time to significantly reduce the AHP (Perez-Garci et al. 2003). Blockage of only one channel type, N or P/Q, has no impact on the AHP in most cases (Perez-Garci et al. 2003). Experiments described above show that muscarinic  $M_1$ -receptor activation modulates both channel types. However, this modulation only partially reduces current through each channel type: 27% of N and 23% of P/Q (see above). Therefore experiments were carried out to see whether this modulation was enough to exert an impact on the AHP, i.e., if a partial reduction of  $Ca^{2+}$  entry through each channel was capable of decreasing the AHP. Figure 7A and B, show that MT-7 impedes the action of muscarine on the AHP ( $n = 3/3$ ). In contrast, muscarine reduced the AHP in the presence of MT-3 ( $n = 4/4$ ; Fig. 7, C and D) (see Pineda et al. 1995). The result then suggests that the AHP in spiny cells is controlled by  $M_1$  but not  $M_4$  muscarinic receptors.

F8 During repetitive firing the AHP generates an important component of the interspike interval in spiny neurons. Accordingly, we next evaluated whether the action on the AHP had any impact on evoked discharge. Figure 8, A-D show that both muscarine ( $1 \mu M$ ) and MT-1 (48 nM) increased evoked discharge in spiny cells (Pineda et al. 1995). An increase in firing frequency of  $44 \pm 6\%$  with respect to the control (range = 23-79%;  $n = 10$ ;  $P < 0.005$ , Wilcoxon's  $t$ -test) was obtained with muscarine and an increase of  $26 \pm 5\%$  (range = 16-38%;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ , Wilcoxon's  $t$ -test) was obtained with MT-1. Figure 8, E and F also show that posttrain (cumulative) AHP was reduced at the same time. Thus muscarinic actions on the AHP have a clear impact on cell excitability (note that a depolarizing holding potential reduces the impact of inward rectification on evoked firing).

Impact on  $\gamma$ -aminobutyric (GABA) release

A way to selectively stimulate the GABAergic terminals that medium spiny neurons have onto other spiny neurons has been

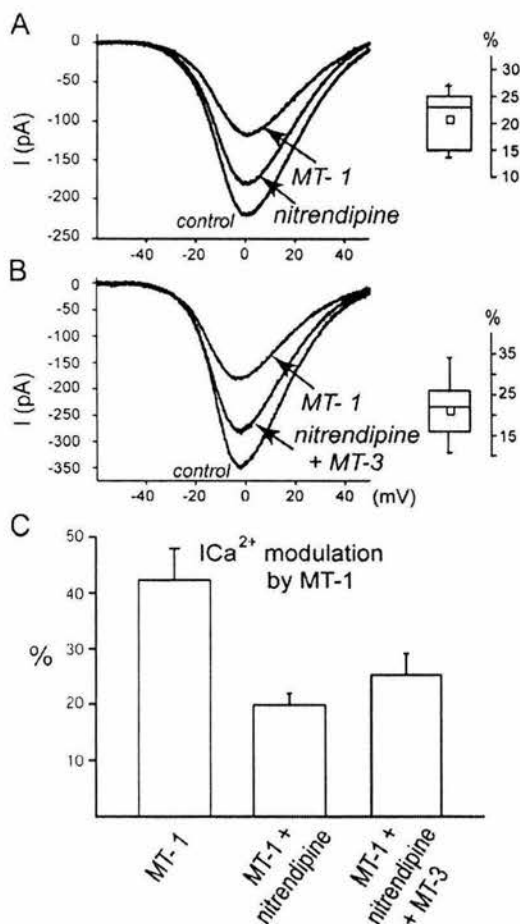
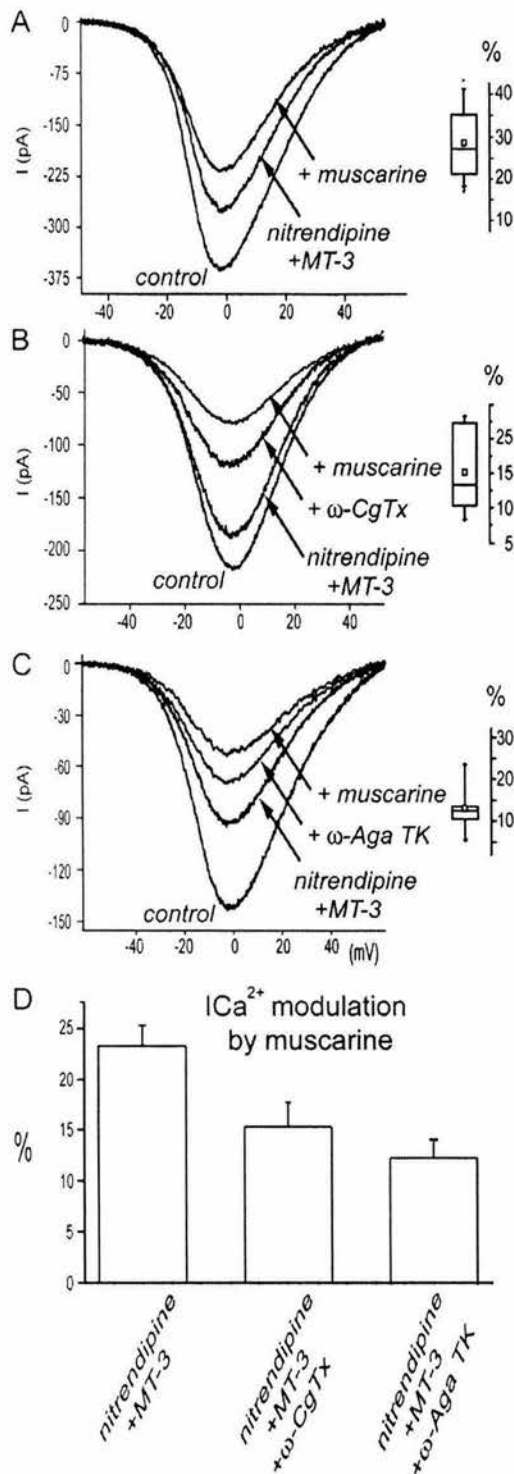


FIG. 5. Blockage of  $M_4$ -type receptors was unable to block MT-1 actions. A and B: note that there are no significant differences on % current reduction caused by the  $M_1$  receptor agonist, the MT-1 peptide (48 nM), in the presence or the absence of the specific  $M_4$  receptor antagonist, the MT-3 peptide. C: histogram summarizing the samples.



F9

described (Guzman et al. 2003; Tecuapetla et al. 2004) (Fig. 9A). These terminals use N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels to trigger GABA release and inhibit other spiny cells (Tecuapetla et al. 2004). Because the above results indicated that cholinergic activation of muscarinic M<sub>1</sub> receptors regulates these same Ca<sup>2+</sup> channels, a presynaptic regulation of GABA re-



lease by M<sub>1</sub> receptors can be hypothesized. The presence of this modulation would indicate that M<sub>1</sub> receptors are transported from the soma to the synaptic terminals of spiny cells. The paired-pulse protocol and the paired-pulse ratio (PPR) were used to find evidence of this presynaptic control (Barral et al. 1999; Guzman et al. 2003). Figure 9B (top) shows a pair of IPSCs evoked from the GP by antidromically exciting the passing axons from spiny cells (i.e., striofugal fibers). Note the slight synaptic facilitation of the second response in control conditions. The addition of muscarine (1 μM) (Fig. 9B, middle) to the bath saline reduced the IPSC amplitude from a mean of 58 ± 5.4 to 22 ± 4 pA (or 60% amplitude reduction in the first response; n = 6; P < 0.01, Wilcoxon's t-test). IPSC reduction coarsed with an increase in PPR or synaptic facilitation in all cells tested (Fig. 9C): from 1.05 ± 0.13 in the control to 1.42 ± 0.16 during muscarine (n = 6; P < 0.05, Wilcoxon's t-test). A time course for this action is illustrated in Fig. 9D, which shows the appearance of failures after muscarine. It was concluded that there is a cholinergic muscarinic modulation of the synaptic terminals that interconnect medium spiny projection neurons.

F10

Figure 10 shows that MT-7 completely blocks this muscarinic effect on synaptic terminals (n = 4; Fig. 10A), whereas MT-3 failed to block it (Fig. 10B) (n = 4). Muscarine still reduced the first IPSC by 52 ± 8% (n = 4) in the presence of MT-3. Consistently, MT-3 did not block the PPR change produced by muscarine (from 1.04 ± 0.01 to 1.34 ± 0.06). It was concluded that, as expected by the types of Ca<sup>2+</sup> channel present on these terminals (Tecuapetla et al. 2004), M<sub>1</sub> muscarinic receptors control the cholinergic modulation that in turn controls GABA release from medium spiny synaptic terminals at this age.

Are both N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels involved in this presynaptic effect? If this were the case, a partial occlusion should be seen after any of their respective blockers. Accordingly, the addition of muscarine in the presence of saturating concentrations of ω-CgTx (1 μM) did not completely block the muscarinic action on the IPSC (Fig. 11A). However, ω-CgTx partially occluded this action to about half (n = 3/3); note the absence of failures (cf. Fig. 9D). The experiment then showed that modulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channels is important for controlling transmitter release in the GABAergic terminals of spiny neurons at this age.

F11

The specific P/Q-type channel blocker, ω-AgaTK, blocked virtually all evoked GABAergic responses when used in saturating concentrations (Tecuapetla et al. 2004). However, for the purposes of the present work, it was only necessary to show that a partial block of P/Q channels was sufficient to produce a partial occlusion of muscarinic actions to imply P/Q channels in the cholinergic actions. Thus the experiment shown in Fig. 10B used only subsaturating concentrations (50 nM) of

FIG. 6. Muscarinic actions arising from M<sub>1</sub>-type receptor activation target both N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. A: blockage of most M<sub>4</sub>-type receptors was achieved with the M<sub>4</sub>-type receptor antagonist MT-3. In this condition, muscarine (1 μM) retained its effects on the Ca<sup>2+</sup> currents unblocked by nitrendipine. B: addition of ω-CgTx (1 μM) partially prevents this effect. C: addition of ω-AgaTK (400 nM) partially prevents this effect. Action of muscarine with both M<sub>1</sub> and M<sub>4</sub>-type receptors available is indistinguishable from that observed with isolated M<sub>1</sub>-type receptors (cf. Fig. 2). D: histogram summarizes these results and suggests that M<sub>1</sub>-receptor activation targets both N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels.

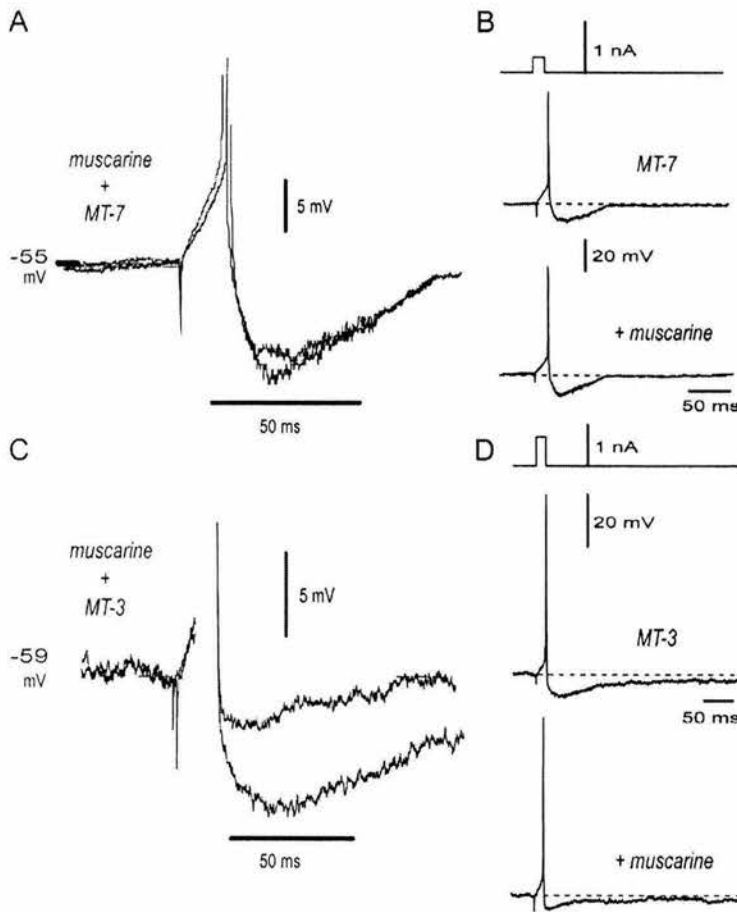


FIG. 7. Muscarinic actions on the afterhyperpolarizing potential (AHP) are attributed to  $M_1$ -type receptor activation. *A*: muscarine ( $1 \mu\text{M}$ ) cannot reduce the AHP when MT-7 ( $30 \text{ nM}$ ) is present in the bath saline. *B*: AHP follows a single action potential evoked with a brief depolarizing current step (at the top). *C*: muscarine ( $1 \mu\text{M}$ ) reduces the AHP when MT-3 ( $20 \text{ nM}$ ) is present in the bath saline. *D*: same protocol as in *B*.

$\omega$ -AgaTK. In the presence of these concentrations of  $\omega$ -AgaTK, muscarine still reduced IPSCs by  $48 \pm 2\%$  ( $n = 4$ ; cf.  $60\%$  without AgaTK; see above), thus yielding again a partial occlusion. Note again the absence of failures in spite of a clear effect (cf. Fig. 9D). The increase in PPR was also partially occluded from  $0.95 \pm 0.13$  to only  $1.14 \pm 0.21$ . To summarize,  $M_1$ -receptor action on synaptic terminals of medium spiny cells modulates both N- and P/Q-channel types to regulate GABA release.

#### DISCUSSION

The present results demonstrate that cholinergic modulation of  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q-type) and  $\text{Ca}_v2.2$  (N-type)  $\text{Ca}^{2+}$  channels in neostriatal neurons is preferentially mediated by the activation of muscarinic  $M_1$ -type receptors, suggesting that the signaling cascade that mediates this modulation is a slow diffusible pathway, probably linked to phospholipase C and protein kinase C (Caulfield and Birdsall 1998; Jones 1993; Perez-Rosello et al. 2004).  $M_1$ -receptor actions on N- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels importantly resulted in modulating the discharge frequency of spiny neurons (neostriatal output) and the surrounding inhibitory control between spiny cells (neostriatal lateral inhibition). Therefore ACh both facilitates firing frequency and inhibits GABAergic interconnections. These 2 actions combined should lead to an increase in the recruitment of projection neurons (Wickens and Oorschot 2000). In addition,

it has been reported that muscarinic actions presynaptically inhibit glutamatergic afferents from the cortex (Barral et al. 1999; Calabresi et al. 2000; Hernandez-Echeagaray et al. 1998) and postsynaptically potentiate *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-dependent responses (Calabresi et al. 1998). Assuming that these actions may go on simultaneously, what then is the global action? Similar results in the cortex, fed to a network model, led to the hypothesis that ACh selects some incoming afferents, while simultaneously ensuring that the recipient neurons respond vigorously to these afferents. This may improve the encoding of new memory traces (Hasselmo and McGaughy 2004).

In addition to the results obtained with specific peptide antagonists (see RESULTS), our experiments were dedicated to see whether the modulation had a voltage-dependent component that yielded negative results (data not shown). Although  $M_4$ -type receptors do not necessarily use a voltage-dependent pathway (Shapiro et al. 1999), when taken together, the available evidence suggests that  $M_4$ -type ( $M_2$ -class) receptors are not the main regulators of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in neostriatal projection neurons (see Bernheim et al. 1992; Liu and Rittenhouse 2003; Shapiro et al. 1999). Thus the relatively high abundance of  $M_4$ -type receptors (Potter et al. 2004) is still in need of an explanation (Bernard et al. 1992; Potter et al. 2004; Yan et al. 2001).  $M_2$ -class receptors are the main regulators of  $\text{Ca}^{2+}$  channels and firing of cholinergic interneurons (Calabresi et al.

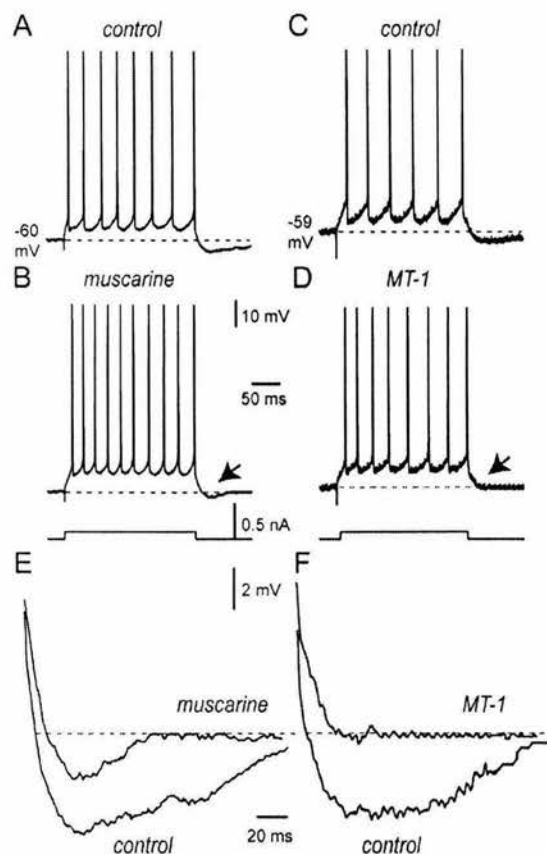


FIG. 8. Muscarinic actions on the AHP affect firing frequency. *A*: discharge evoked with a current step in control conditions. *B*: same stimulus causes the cell to fire at a higher frequency when muscarine (1  $\mu$ M) is present in the bath saline. Note a reduction in the posttrain AHP (arrow). *C* and *D*: M<sub>1</sub> receptor selective agonist MT-1 (48 nM) mimics the actions of muscarine. *E* and *F*: posttrain AHPs are enlarged and superimposed, before and during the addition of muscarinic agonists.

2000; Galarraga et al. 1999; Yan and Surmeier 1996), indicating that different signaling systems are used for projection neurons and interneurons.

#### Ca<sup>2+</sup> current in spiny neurons and muscarinic receptors

A muscarinic reduction of Ca<sup>2+</sup> action potentials had been described in neostriatal neurons (Misgeld et al. 1986). Although the present voltage-clamp experiments were done in dissociated cells without dendrites, recordings were obtained from 6–7 pF cells, which were the majority in the preparation, and were previously characterized as somata belonging to medium spiny neurons (Yan and Surmeier 1996). Moreover, percentages of Ca<sup>2+</sup> current types, similar to those found here, have been shown to be expressed in both substance P and enkephalin-containing striatal neurons (Bargas et al. 1994). Finally, the impact of M<sub>1</sub> muscarinic actions was also tested by recording neurons in slices, and many of these neurons were filled with biocytin and later seen as medium spiny. This made us reasonably sure that the results presented here can be attributed to medium spiny neostriatal projection neurons.

Up to now, precise identification of the main cholinergic receptor involved in controlling Ca<sup>2+</sup> entry in spiny neurons

had been hampered by the lack of specific receptor agonists and antagonists (Caulfield and Birdsall 1998; Jones 1993). The presence of both M<sub>1</sub>- and M<sub>4</sub>-type muscarinic receptors (Bernard et al. 1992; Yan and Surmeier 1996; Zhou et al. 2003) had obscured previous results because, for example, pirenzepine has a weak preference for M<sub>1</sub>- over M<sub>4</sub>-type receptors and both pirenzepine and the MT-3 peptide compete for the M<sub>4</sub>-type receptor (Olianas et al. 1996; Purkerson and Potter 1998). This prompted some investigators to classify pirenzepine as a selective M<sub>1/4</sub> antagonist (see Caulfield and Birdsall 1998), not adequate to be used on cells with both receptor types.

Because of this uncertainty, we resorted to muscarinic ligands that are considered as the most selective antagonists found to date: the MT-3 and MT-7 peptides. MT-7 has a 4 orders-of-magnitude higher affinity for M<sub>1</sub>- over M<sub>4</sub>-type receptors. Conversely, MT-3 has a 100-fold higher affinity for M<sub>4</sub> than for M<sub>1</sub> receptors (Caulfield and Birdsall 1998; Karlsson et al. 2000; Potter et al. 2004). It was assumed that the combined use of both peptides on medium spiny cells would tend to decrease error. Besides, these peptides have been seen to affect the function, at the systems level, of several brain circuits, including the neostriatum (Cuevas and Adams 1997; Karlsson et al. 2000; Marino et al. 1998; Potter et al. 2004; Purkerson and Potter 1998).

It was under these conditions that a preferential muscarinic modulation of Ca<sub>v</sub>2.1 (P/Q-type) and Ca<sub>v</sub>2.2 (N-type) Ca<sup>2+</sup> channels by M<sub>1</sub>-type receptors was observed. High levels of mRNA expression for M<sub>1</sub> muscarinic receptor have been found in virtually all medium spiny neurons tested, whereas the messenger for M<sub>4</sub> muscarinic receptors is only weakly present in subsets of these neurons (Bernard et al. 1992; Yan et al. 2001). In agreement with this, muscarinic inhibition of N- and/or P/Q-type Ca<sup>2+</sup> currents was consistently seen, with the expected variability, in all neurons tested for the present study. This adds up to other probable M<sub>1</sub>-receptor actions on spiny cells (Calabresi et al. 1998; Galarraga et al. 1999; Howe and Surmeier 1995; Hsu et al. 1996; Pineda et al. 1995).

#### Impact of Ca<sup>2+</sup> current modulation on the firing pattern

Ca<sup>2+</sup> entry through N and P/Q channels, in particular, makes up the Ca<sup>2+</sup> source that activates Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal spiny neurons (Vilchis et al. 2000). These K<sup>+</sup> currents are not activated by Ca<sup>2+</sup> entry through L-type Ca<sup>2+</sup> channels (Vilchis et al. 2000), which have a completely different function (Perez-Garci et al. 2003; see also Catterall 1998; Reuter 1996). In turn, Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents generate the AHP (Bargas et al. 1999; Galarraga et al. 1989; Pineda et al. 1992) and are thus in position to regulate the interspike interval and the firing frequency. However, N and P/Q channels need to cooperate to tune the firing frequency because the complete blockade of only one of them, N or P/Q, is not sufficient to significantly change the firing frequency. Both have to be inhibited simultaneously to increase evoked discharge (Perez-Garci et al. 2003). However, the muscarinic modulation described in this work involves only a partial reduction of each current type (between 20 and 30% in each case). Then, one question is whether this partial modulation is sufficient to change the firing frequency. The present experiments show that partial muscarinic modulation of both channel types (N and P/Q), by M<sub>1</sub>-type receptors, was enough to

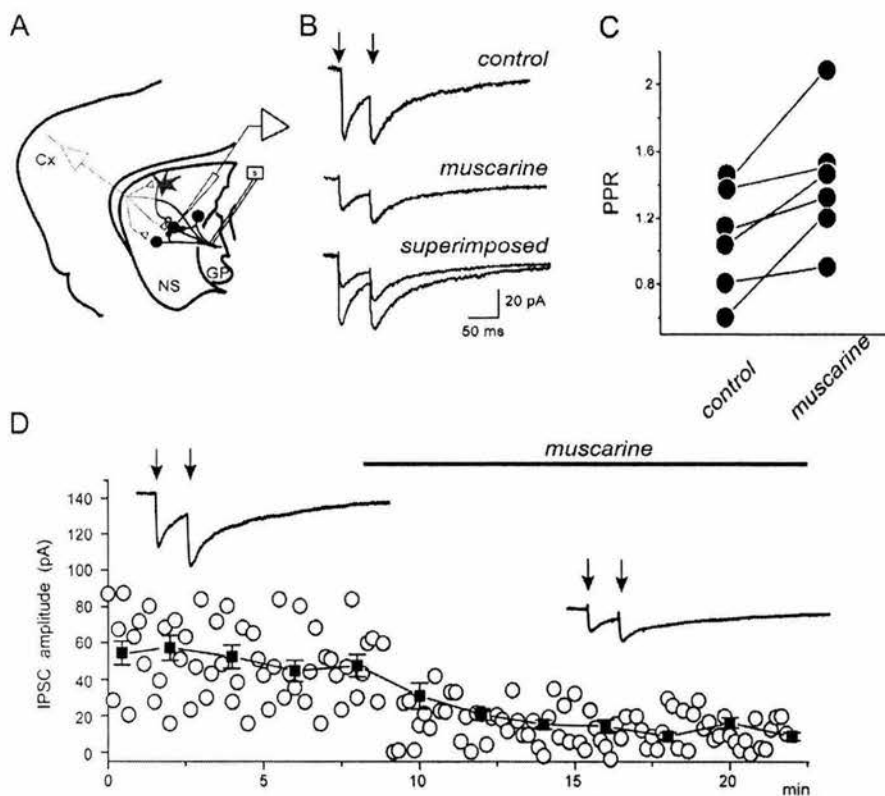


FIG. 9. Muscarinic presynaptic inhibition of inhibitory synapses between spiny neurons. *A*: experimental protocol: Stimulating electrode was placed on the globus pallidus (GP) to antidromically activate the passing axons of medium spiny cells while recording in one spiny cell. CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ) plus AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) together block all glutamatergic fast synaptic transmission (Guzman et al. 2003). *B*: a pair of stimuli (50-ms interstimulus interval; 2 V/0.2 ms) elicited inhibitory postsynaptic currents in control conditions (control). Amplitude of these responses was reduced by muscarine ( $1 \mu\text{M}$ ) (middle). Superimposition of both traces is at the bottom. *C*: paired-pulse ratio (PPR) increased in all cases tested, suggesting a presynaptic effect. *D*: time course of muscarine's action in another cell. Numerous failures always appeared after muscarine.

significantly reduce the AHP and to cause an increase in firing frequency. The participation of the  $M_4$ -type receptor in these actions was negligible. Moreover, MT-1 concentrations that selectively activate  $M_1$ -type receptors mimicked muscarine actions. The almost complete blockage of these actions by MT-7 ( $M_1$  antagonist) and the absence of effects of the MT-3 peptide ( $M_4$  antagonist) indicated that the effects occurred, virtually exclusively, by the  $M_1$  modulation of N- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

This may prove to be important for understanding striatal physiology because another important transmitter, dopamine, uses a similar signaling pathway by  $D_2$  receptors to modulate  $\text{Ca}^{2+}$  currents and to induce changes of firing frequency in

these neurons (Hernandez-Lopez et al. 2000): both  $D_2$  and  $M_1$  receptors decrease  $\text{Ca}^{2+}$  flow through L- and other  $\text{Ca}^{2+}$ -channel types. Unexpectedly, however, the changes these transmitters produce are opposite:  $D_2$  receptor activation *decreases* (Hernandez-Lopez et al. 2000), whereas  $M_1$  receptor activation *increases* firing frequency (Galarraga et al. 1999), as seen in the present work. In the case of  $D_2$  receptors, the effect on L-type current is predominant because the result of reducing this current is a decrease in firing (Hernandez-Lopez et al. 2000; Olson et al. 2001; Perez-Garci et al. 2003; see also Catterall 1998). Consequently, this cannot be the main effect of muscarinic  $M_1$  receptors because their activation increases firing. Therefore the main effect of producing changes in firing has to be the reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  currents that activate the AHP and, possibly, some additional effects on other  $\text{K}^+$  currents. The present data then reveal an intriguing divergence of effects for receptors that supposedly use the same signaling cascade (Rakhilin et al. 2004).

#### $M_1$ modulation of synaptic transmission

Finally, the present findings indicate that GABA release from axon collaterals of medium spiny neurons is also controlled by  $M_1$ -receptor activation. This is a departure from the commonly used membrane-delimited pathway used in many synaptic terminals (Currie and Fox 2002). It is also a counter-intuitive result because the Gq/11-PLC pathway may lead to  $\text{IP}_3$  formation and  $\text{Ca}^{2+}$  increase in the synaptic terminals with a consequent enhancement of synaptic transmission (Chameau et al. 2001; Yang et al. 2001). However, presynaptic inhibition has been reported for transmitters that use the Gq/11-PLC

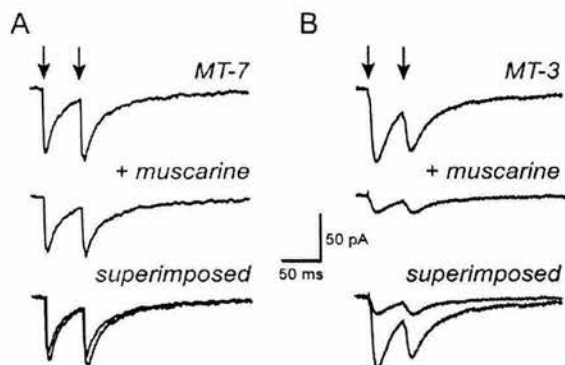


FIG. 10. Muscarinic presynaptic actions are attributed to  $M_1$ -type receptors. *A*: specific  $M_1$ -type receptor antagonist, MT-7 ( $30 \text{ nM}$ ), almost completely blocked the presynaptic action of muscarine ( $1 \mu\text{M}$ ). *B*: in contrast, the specific  $M_4$ -type receptor antagonist did not significantly affect muscarine action. Note increase in PPR.

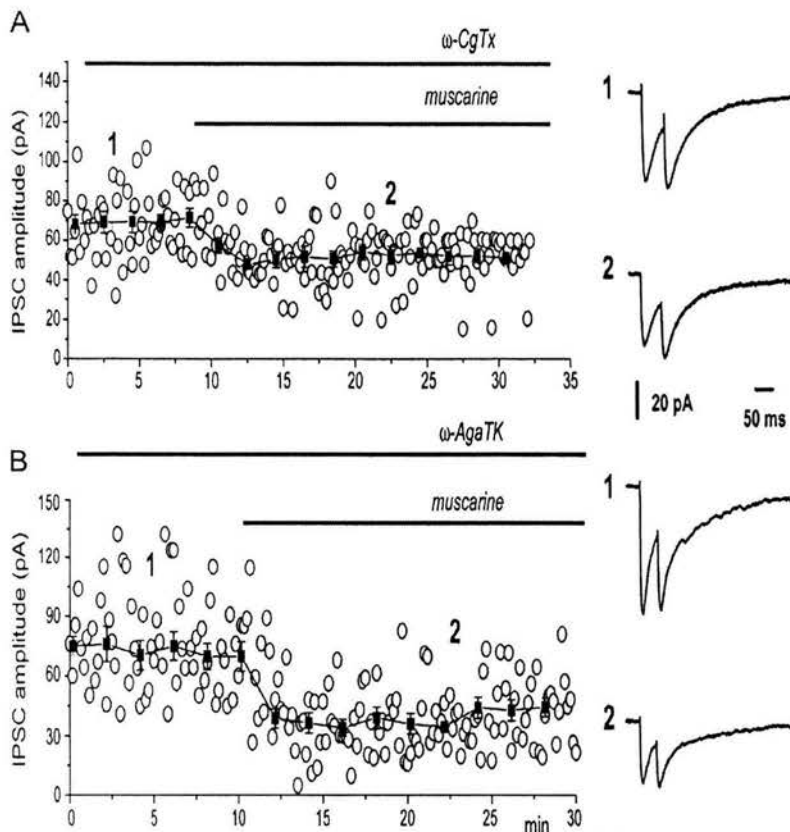


FIG. 11. Activation of  $M_1$ -type receptors modulates both N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels at synaptic terminals of spiny neurons. *A*: a partial block of  $Ca^{2+}$  entry to the synaptic terminal by  $\omega$ -CgTx ( $1 \mu M$ ) (N-channel blocker) partially occludes the action of muscarine on synaptic transmission (cf., Fig. 8*D*). *B*: a partial block of  $Ca^{2+}$  entry to the synaptic terminal by  $\omega$ -AgaTK ( $50 nM$ ) (P/Q-channel blocker) partially occludes the action of muscarine on synaptic transmission. Note that partial occlusion was such that, although a reduction in amplitude is obvious, failures were rare. An increase in PPR was obvious in every case.

signaling pathway, including muscarinic agonists (e.g., Hernandez-Echeagaray et al. 1998; Kimura and Baughman 1997; Tan et al. 2003).

Muscarinic inhibition of GABA release in the neostriatum has previously been reported in synaptosomal preparations (Raiteri et al. 1990) and in *in vivo* microdialysis studies (Smolders et al. 1997). In addition, field-evoked GABAergic potentials have been reported to be inhibited by muscarinic agonists, an effect that was blocked by pirenzepine (Kimura and Baughman 1997; Momiyama and Koga 2001; Sugita et al. 1991). Nevertheless, the actions reported with the use of brain slice preparations have been conflicting: both muscarinic inhibition and stimulation of GABA release have been described (Harsing and Zigmund 1998; Kayadjanian et al. 1994; Kuriyama et al. 1984), probably arising from an unspecific augmentation of spiny neurons excitability that surpasses the presynaptic inhibition of GABA release. Alternatively, indirect effects are possible because several interneurons also express muscarinic receptors (Bernard et al. 1992; Galarraga et al. 1999; Hersch and Levey 1995; Yan and Surmeier 1996).

Thus to study muscarinic actions on GABAergic transmission, the present work made use of isolated inhibitory synaptic currents (IPSCs) from the recurrent axon collaterals that interconnect spiny neurons (see Guzman et al. 2003; Tecuapetla et al. 2004). In this defined set of afferents, muscarine produced a reduction of evoked IPSCs, accompanied by an increase in the paired-pulse ratio, suggesting presynaptic inhibition. These actions were virtually abolished by MT-7 but not by MT-3.

Therefore the actions were mediated by  $M_1$ -type receptors. This outcome fits well with  $M_1$  actions on somatic  $Ca^{2+}$  currents (see above) because N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels control synaptic transmission in this and many other synapses (Momiyama and Koga 2001; Murakami et al. 2002; Reuter 1996; Rhee et al. 1999; Tecuapetla et al. 2003; Wheeler et al. 1994; Wu and Saggau 1994). However, because the channel types used at the synaptic terminals may change during development (Iwasaki et al. 2000; Momiyama 2002; Urbano et al. 2002), we asked whether muscarinic actions specially targeted a defined type of  $Ca^{2+}$  channel at the terminals. Our data indicated that both N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels were equally targeted at this stage.

In summary, most  $Ca^{2+}$  channel modulation in spiny neostriatal neurons falls into the  $M_1$ -type receptor domain. The same is true for the inward rectification and input conductance (leak) of these cells (Figueroa et al. 2002; Galarraga et al. 1999). It is concluded that  $M_1$  receptors are a predominant factor in regulation of the excitability of neostriatal projection neurons. These results are expected to explain, in part, the important cholinergic actions of basal ganglia physiology found or inferred from clinical and systems studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank D. Tapia and A. Laville for technical support. A. Perez-Burgos collaborated in some final experiments.

#### GRANTS

This work was supported by the following grants: Dirección General de Asuntos del Personal Académico–Universidad Nacional Autónoma de México

IN201603 and IN219304 to J. Bargas and IN200803 and IN205804 to E. Galarraga and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Grants 31839 to J. Bargas and 42636 to E. Galarraga.

## REFERENCES

- Allen TG and Brown DA.  $M_2$  muscarinic receptor-mediated inhibition of the  $Ca^{2+}$  current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. *J Physiol* 466: 173–189, 1993.
- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, and Galarraga E.  $Ca^{2+}$ -activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88: 479–488, 1999.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, and Surmeier DJ. Cellular and molecular characterization of  $Ca^{2+}$  currents in acutely-isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14: 6667–6686, 1994.
- Barral J, Galarraga E, and Bargas J. Muscarinic presynaptic inhibition of glutamatergic afferents is mediated by Q type  $Ca^{2+}$  channels. *Brain Res Bull* 49: 285–289, 1999.
- Bernard V, Normand E, and Bloch B. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci* 12: 3591–3600, 1992.
- Bernheim L, Mathie A, and Hille B. Characterization of muscarinic receptors subtypes inhibiting  $Ca^{2+}$  current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9544–9548, 1992.
- Bolam JP, Wainer BH, and Smith AD. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12: 711–718, 1984.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G, and Bernardi G. Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 61: 231–265, 2000.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, and Bernardi G. Endogenous Ach enhances striatal NMDA-responses via  $M_1$ -like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci* 10: 2887–2895, 1998.
- Catterall WA. Structure and function of neuronal  $Ca^{2+}$  channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24: 307–323, 1998.
- Caulfield MP and Birdsall NJM. International union pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279–290, 1998.
- Chameau P, Van de Vrede Y, Fossier P, and Baux G. Ryanodine-, IP3- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pfluegers Arch* 443: 289–296, 2001.
- Cuevas J and Adams DJ.  $M_4$  muscarinic receptor activation modulates calcium channel currents in rat intracardiac neurons. *J Neurophysiol* 78: 1903–1912, 1997.
- Currie KP and Fox AP. Differential facilitation of N- and P/Q-type calcium channels during trains of action potential-like waveforms. *J Physiol* 539: 419–431, 2002.
- Figuroa A, Galarraga E, and Bargas J. Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46: 215–223, 2002.
- Galarraga E, Bargas J, Sierra A, and Aceves J. The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75: 157–168, 1989.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, and Bargas J. Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19: 3629–3638, 1999.
- Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, and Bargas J. Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23: 8931–8940, 2003.
- Harsing LG and Zigmond MJ. Postsynaptic integration of cholinergic and dopaminergic signals on medium-sized GABAergic projection neurons in the neostriatum. *Brain Res Bull* 45: 607–613, 1998.
- Hasselmo ME and McGeughy J. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res* 145: 207–231, 2004.
- Hernandez-Echeagaray E, Galarraga E, and Bargas J. 3- $\alpha$ -Chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37: 1493–1502, 1998.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, and Surmeier DJ.  $D_2$  dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type  $Ca^{2+}$  currents and excitability via a novel PLC $\beta$ 1-IP $_3$ -calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20: 8987–8995, 2000.
- Hersch SM and Levey AI. Diverse pre- and post-synaptic expression of m1–m4 muscarinic receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. *Life Sci* 56: 931–938, 1995.
- Howe AR and Surmeier JD. Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type  $Ca^{2+}$  currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15: 458–469, 1995.
- Hsu KS, Yang CH, Huang CC, and Gean PW. Carbachol induces inward current in neostriatal neurons through  $M_1$ -like muscarinic receptors. *Neuroscience* 73: 751–760, 1996.
- Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, and Takahashi T. Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20: 59–65, 2000.
- Jerusalinsky D, Cervenasky C, Pena C, Raskovsky S, and Dajas F. Two polypeptides from *Dendroaspis angusticeps* venom selectively inhibit the binding of central muscarinic cholinergic receptor ligands. *Neurochem Int* 20: 237–246, 1992.
- Jerusalinsky D and Harvey AL. Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 15: 424–433, 1994.
- Jones SVP. Muscarinic receptors subtypes: modulation of ion channels. *Life Sci* 52: 457–464, 1993.
- Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P, and Adem A. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82: 793–806, 2000.
- Kayadjanian N, Giovanni H, Menetrey A, and Besson MJ. Muscarinic receptor stimulation increases the spontaneous  $^3H$ GABA release in the rat substantia nigra through muscarinic receptors localized on striatonigral terminals. *Neuroscience* 63: 989–1002, 1994.
- Kimura F and Baughman RW. Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77: 709–716, 1997.
- Kornisiuk E, Sanchez G, Cerveñansky C, Duran R, and Jerusalinsky D. Muscarinic toxins and their actions on muscarinic inhibition of adenylyl cyclase activity. *J Neurochem* 78, Suppl 1: BP18–BP37, 2001.
- Kuriyama K, Kanmori K, Taguchi J, and Yoneda Y. Stress-induced enhancement of suppression of [ $^3H$ ]GABA release from striatal slices by presynaptic autoreceptor. *J Neurochem* 42: 943–950, 1984.
- Liu L and Rittenhouse AR. Pharmacological discrimination between muscarinic receptor signal transduction cascades with bethanechol chloride. *Br J Pharmacol* 138: 1259–1270, 2003.
- Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT, and Conn PJ. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11465–11470, 1998.
- Melliti K, Meza U, and Adams BA. RGS2 blocks slow muscarinic inhibition of N-type  $Ca^{2+}$  channels reconstituted in a human cell line. *J Physiol* 532: 337–347, 2001.
- Misgeld U, Calabresi P, and Dodt HU. Muscarinic modulation of calcium dependent potentials in rat neostriatal neurons. *Pfluegers Arch* 407: 482–487, 1986.
- Momiyama T. Dopamine receptors and calcium channels regulating striatal inhibitory synaptic transmission. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120: 61P–63P, 2002.
- Momiyama T and Koga E. Dopamine  $D_2$ -like receptors selectively block N-type  $Ca^{2+}$  channels to reduce GABA release onto rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 533: 479–492, 2001.
- Mural Y, Ishibashi H, Akaike N, and Ito Y. Acetylcholine modulation of high-voltage-activated calcium channels in the neurones acutely dissociated from rat paratracheal ganglia. *Br J Pharmacol* 123: 1441–1449, 1998.
- Murakami N, Ishibashi H, Katsurabayashi S, and Akaike N. Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. *Brain Res* 951: 121–129, 2002.
- Olianas MC, Adem A, Karlsson E, and Onali P. Rat striatal muscarinic receptors coupled to the inhibition of adenylyl cyclase activity: potent block by the selective m4 ligand muscarinic toxin 3 (MT3). *Br J Pharmacol* 118: 283–288, 1996.
- Olson PA, Platzer J, Streissnig J, Miller RJ, and Surmeier DJ. Cav 1.3 channels are primary determinants of L-type calcium currents in striatal medium spiny neurons. *Soc Neurosci Abstr* 31: 67.12, 2001.
- Perez-Garci E, Bargas J, and Galarraga E. The role of  $Ca^{2+}$  channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14: 1253–1256, 2003.
- Perez-Rosello T, Figuroa A, Vilchis C, Salgado H, Galarraga E, and Bargas J. Muscarinic  $M_1$  receptor activation modulates non-L type  $Ca^{2+}$

- currents in neostriatal projection neurons. *Soc Neurosci Abstr* 30: 740.5, 2000.
- Perez-Rosello T, Salgado H, Figueroa A, Guzman JN, Vilchis C, Tecuapetla F, Galarraga E, and Bargas J. Muscarinic actions on Ca<sub>v</sub>2.1 and Ca<sub>v</sub>2.2 currents of neostriatal projection neurons. *Soc Neurosci Abstr* 33: 705.4, 2003.
- Perez-Rosello T, Salgado H, Perez-Burgos A, Vilchis C, Galarraga E, and Bargas J. Ca<sub>v</sub>2 family of calcium channels in neostriatal spiny neurons are modulated by the activation of M<sub>1</sub> type muscarinic receptors via a Gq11/PLC/DAG/PKC signaling cascade. *Soc Neurosci Abstr* 34: 593.1, 2004.
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J, and Galarraga E. Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281: 271–277, 1995.
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, and Aceves J. Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68: 287–294, 1992.
- Potter LT, Flynn DD, Liang JS, and McCollum MH. Studies of muscarinic neurotransmission with antimuscarinic toxins. *Prog Brain Res* 145: 121–128, 2004.
- Purkerson SL and Potter LT. Use of antimuscarinic toxins to facilitate studies of striatal muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 707–713, 1998.
- Raiteri M, Marchi M, Paudice P, and Pittaluga A. Muscarinic receptors mediating inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid release in rat corpus striatum and their pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 496–550, 1990.
- Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, Starkova NN, Fienberg AA, Nairn AC, Surmeier DJ, and Greengard P. A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science* 306: 698–701, 2004.
- Reuter H. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 6: 331–337, 1996.
- Rhee JS, Ishibashi H, and Akaike N. Calcium channels in the GABAergic presynaptic nerve terminals projecting to Meynert neurons of the rat. *J Neurochem* 72: 800–807, 1999.
- Shapiro MS, Loose MD, Hamilton SE, Nathanson NM, Gomeza J, Wess J, and Hille B. Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10899–10904, 1999.
- Smolders I, Bogaert L, Ebinger G, and Michotte Y. Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis. *J Neurochem* 68: 1942–1948, 1997.
- Sugita S, Uchimura N, Jiang ZG, and North RA. Distinct muscarinic receptors inhibit release of gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2608–2611, 1991.
- Tan Y, Hori N, and Carpenter DO. The mechanism of presynaptic long-term depression mediated by group I metabotropic glutamate receptors. *Cell Mol Neurobiol* 23: 187–203, 2003.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzmán JN, Galarraga E, and Bargas J. Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* doi: 10.1152/jn.00657.2004.
- Urbano FJ, Rosato-Siri MD, and Uchitel OD. Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions. *Mol Membr Biol* 19: 293–300, 2002.
- Vilaro MT, Wiederhold KH, Palacios JM, and Mengod G. Muscarinic cholinergic receptors in the rat caudate-putamen and olfactory tubercle belong predominantly to the m4 class: in situ hybridization and receptor autoradiography evidence. *Neuroscience* 40: 159–167, 1991.
- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, and Galarraga E. Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95: 745–752, 2000.
- Vilchis C, Bargas J, Pérez-Roselló T, Salgado H, and Galarraga E. Somatostatin modulates Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 109: 555–567, 2002.
- Volpicelli LA and Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* 145: 59–66, 2004.
- Wanke E, Bianchi L, Mantegazza M, Guatteo E, Mancinelli E, and Ferroni A. Muscarinic regulation of Ca<sup>2+</sup> currents in rat sensory neurons: channel and receptor types, dose-response relationships and cross-talk pathways. *Eur J Neurosci* 6: 381–391, 1994.
- Wheeler DB, Randall A, and Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264: 107–111, 1994.
- Wickens JR and Oorschot DE. Neural dynamics and surround inhibition in the neostriatum: a possible connection. In: *Brain Dynamics and the Striatal Complex*, edited by Miller R and Wickens JR. Amsterdam: Harwood Academic, 2000, p. 141–149.
- Wu LG and Saggau P. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3–CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci* 14: 5613–5622, 1994.
- Yan Z, Flores-Hernández J, and Surmeier DJ. Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103: 1017–1024, 2001.
- Yan Z and Surmeier DJ. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16: 2592–2604, 1996.
- Yang F, He X, Feng L, Mizuno K, Liu XW, Russell J, Xiong WC, and Lu B. PI-3 kinase and IP3 are both necessary and sufficient to mediate NT3-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 4: 19–28, 2001.
- Zhou FM, Wilson C, and Dani JA. Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist* 9: 23–36, 2003.

## 5.2 Resultados II

En la segunda parte del proyecto de Tesis Doctoral nos enfocamos a determinar la vía de señalización que está siendo activada cuando son ocupados los receptores muscarínicos  $M_1$  por sus agonistas, en las neuronas estriatales de proyección. Asimismo tratamos de encontrar evidencia de que esta misma vía es utilizada para la modulación de los canales de calcio de la familia  $Ca_v2$ .

### 5.2.1 Participación de la vía de la fosfolipasa C en la inhibición muscarínica de los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$

Debido a que los receptores muscarínicos de la familia  $M1$ , a la cual pertenecen los receptores del tipo  $M_1$ , se acopla preferentemente a la vía de la PLC, lo primero fue explorar si esta enzima estaba siendo activada al unirse los agonistas colinérgicos muscarínicos a sus receptores en las neuronas estriatales de proyección.

Para probar esta hipótesis, provocamos el bloqueo de la actividad de la PLC para observar si la modulación era también bloqueada. Para lo cual utilizamos el inhibidor específico de la PLC, el U-73122 ( $10 \mu\text{M}$ ), al mismo tiempo que aplicábamos muscarina ( $1 \mu\text{M}$ ) como agonista. Las células se incubaron durante 20 min con el inhibidor, y este también se colocó en la pipeta de registro. Simultáneamente bloqueamos los canales de calcio de tipo  $Ca_v1$  (L) con nitrendipina ( $10 \mu\text{M}$ ) y los receptores muscarínicos  $M_4$  con el antagonista específico MT-3 ( $15 \text{nM}$ ) para así quedarnos exclusivamente con los receptores de tipo  $M_1$  y los canales de calcio de la clase  $Ca_v2$ . En la figura 1A se muestra primero, la aplicación de la nitrendipina, en presencia del bloqueo de los receptores  $M_4$ .



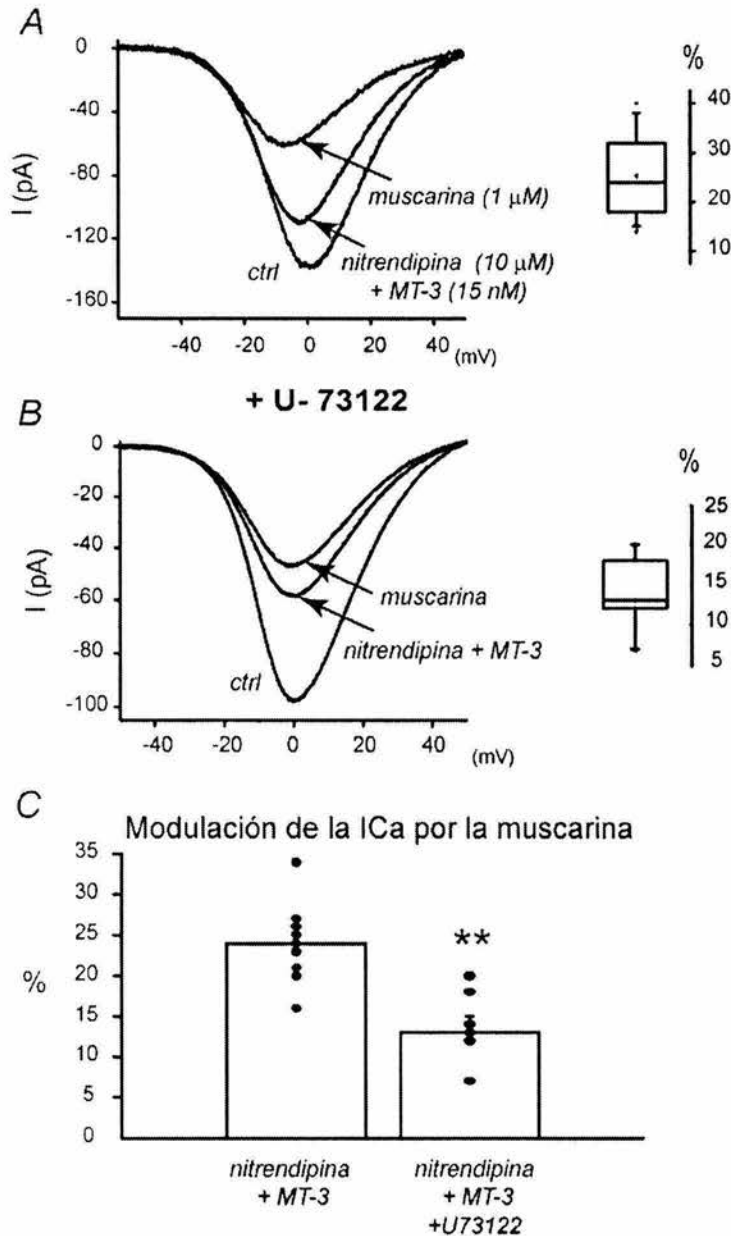


Figura 1. Una parte de la modulación muscarínica  $M_1$  sobre las corrientes de calcio  $Cav_2$  se lleva a cabo mediante la cadena de señalización que involucra a la PLC.

A. Una vez bloqueados los canales  $Cav_1$  y los receptores  $M_4$ , la muscarina es capaz de reducir la corriente de calcio en alrededor de un 25%. B. Sin embargo, cuando el mismo experimento se repite en presencia del inhibidor de la PLC: U-73122, significativamente se reduce la modulación muscarínica; quedando solo cerca de un 10% de la misma. C. Las diferencias son significativas.

Note que la I<sub>Ca</sub> se redujo al bloquear a los canales de calcio de tipo  $Cav_1$ . Después, la aplicación del agonista muscarina redujo la corriente  $Ca^{2+}$  en un  $24 \pm 2\%$  ( $n = 9$ ; Fig. 1A). Sin embargo, en presencia del inhibidor de la PLC, el U-73122, la reducción de la corriente es parcialmente inhibida a un:  $13 \pm 2\%$  ( $n = 7$ ; Fig. 1B;  $P < 0.05$ , U de Mann-Whitney). Este resultado se interpreta como que la inhibición de la PLC bloquea parcialmente la acción muscarínica sobre los canales de calcio, lo que sugiere que una parte de los

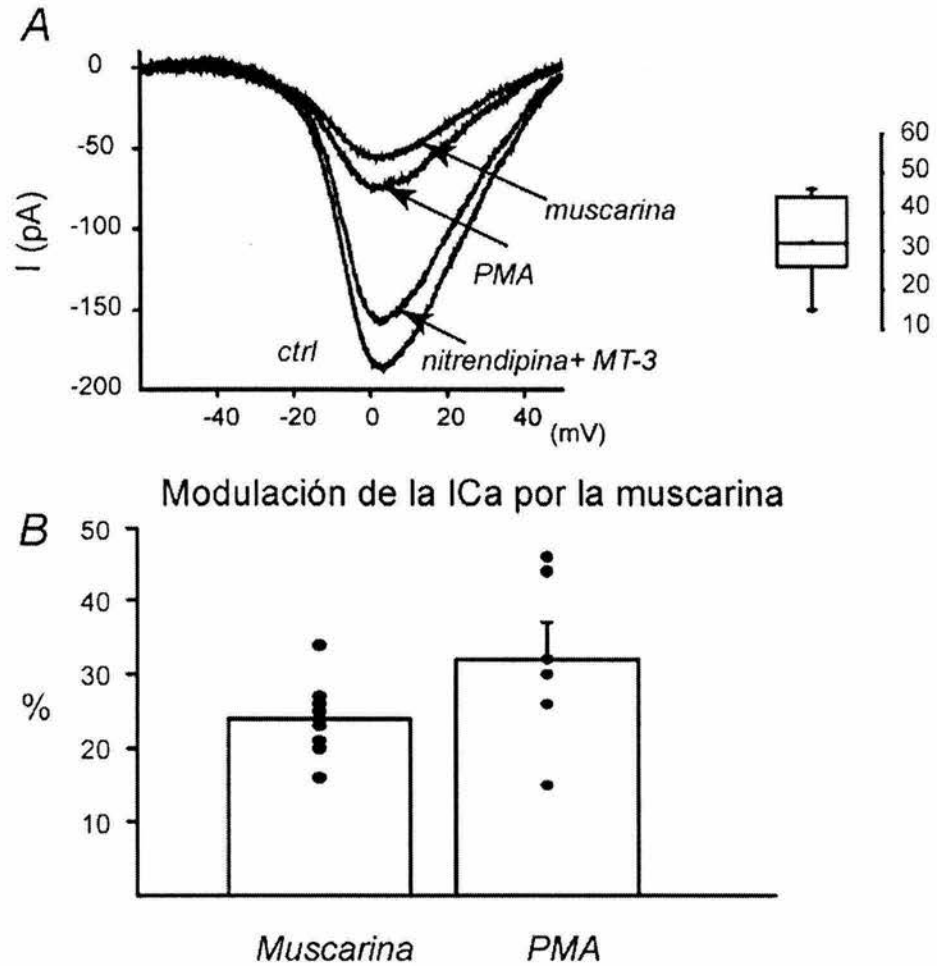
efectos que se producen con la activación de los receptores muscarínicos  $M_1$  ocurren a través de la vía de la PLC.

En el histograma de la figura 1C se ilustra la comparación de los porcentajes medios de inhibición de la corriente de  $Ca^{2+}$  por el agonista muscarina, en ausencia y en presencia de U-73122.

### 5.2.2 Participación de la proteína cinasa C

Si la PLC es la enzima que comienza la cadena de señalización más común utilizada por los receptores  $M_1$ , la PKC es la enzima que la termina, así es que fuimos a probar si la activación de la enzima PKC era capaz de mimetizar el efecto muscarínico sobre las corrientes de calcio. En la figura 2A se muestran los efectos del activador de la PKC (isoformas PKC $\alpha$  y PKC $\gamma$ ), por el éster de forbol miristate acetate (PMA), análogo no competitivo de DAG, sobre la corriente de  $Ca^{2+}$ . Note cómo la aplicación de PMA, en presencia de nitrendipina y MT-3 (para bloquear los canales L y los receptores  $M_4$ ), mimetizó la inhibición producida por la muscarina: control =  $24 \pm 2$  % de reducción (n = 6) y  $32 \pm 5$  % de reducción con el efecto muscarínico, el PMA ocluyó las acciones muscarínicas, ya que el efecto del agonista muscarina se vió reducido después de la aplicación de PMA (Fig. 2A).

Además de que la activación de la PKC mimetizó, el PMA ocluyó las acciones muscarínicas, ya que el efecto del agonista muscarina se vió reducido después de la aplicación de PMA (Fig. 2A). La gráfica de barras muestra un resumen donde se compara el porcentaje medio de inhibición de la corriente de  $Ca^{2+}$  cuando se aplica el agonista muscarina o el PMA (n = 9; NS, U de Mann Whitney).



**Figura 2.** La activación de la PKC mimetiza la modulación muscarínica de los canales Cav2. A. El PMA (500 nM), activador de la PKC, mimetiza la acción muscarínica sobre las corrientes Cav2 en presencia del bloqueo de los canales de calcio de tipo L y de los receptores M<sub>4</sub>. Note que después de que el PMA ha actuado, la posterior adición de muscarina casi no tiene efecto. B. El histograma resume estos resultados (NS, U de Mann Whitney).

Aunque los esteres de forbol se usan ampliamente como agonistas para determinar si los efectos son mediados por la PKC, existen otros receptores para los esteres de forbol (Brose y Rosenmund, 2002). Por esta razón, probamos la especificidad de las acciones de la PKC usando dos inhibidores de esta enzima, la bisindolmaleimida (BIS), y el péptido PKC 19-36. La BIS se une al sitio catalítico que une al ATP en todas las PKC (clásicas,

nuevas y atípicas), mientras que el PKC 19-36 se une al sitio del pseudosustrato, e inhibe así a todas las PKC excepto a la PKC $\mu$ .

Para estudiar el efecto de la BIS (200 nM), las células se incubaron alrededor de media hora con el fármaco además de añadirlo a la superfusión. Por su parte, el péptido PKC 19-36 (50  $\mu$ M) se colocó en la pipeta de registro (sol. intracelular).

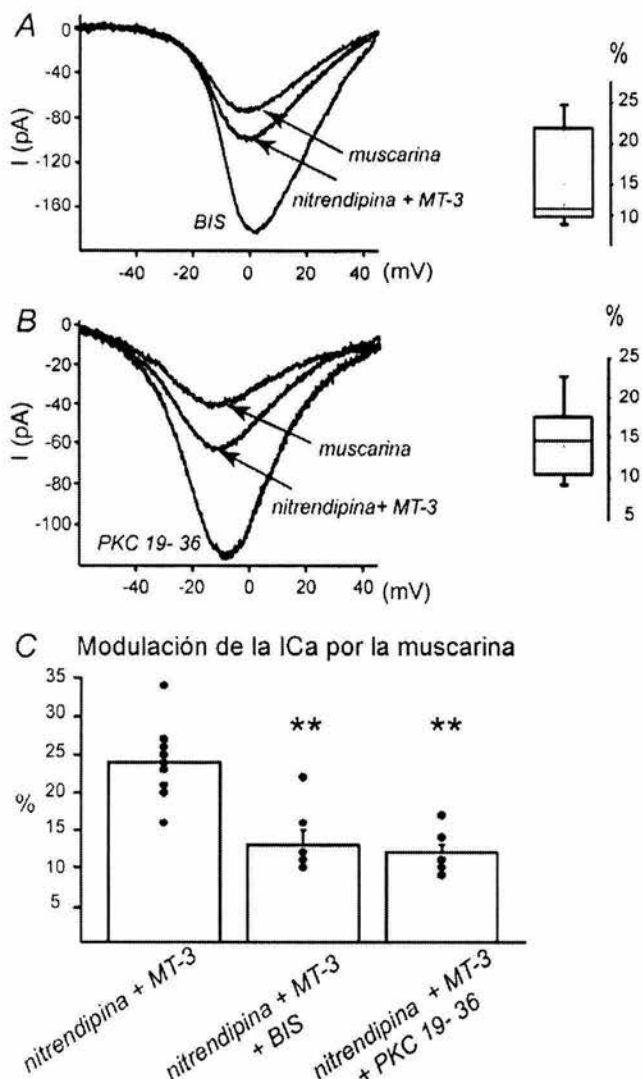
En presencia de estos inhibidores de la PKC (Fig. 3A, B), el efecto modulador de la muscarina se vió reducido significativamente:  $12 \pm 1$  % (n = 5; P < 0.05, U de Mann Whitney) en presencia del péptido PKC 19-36, y  $13 \pm 2$  (n = 6; P < 0.05, U de Mann Whitney) en presencia de BIS. Lo que quiere decir que ambos inhibidores reducen la modulación en un porcentaje similar al producido por el bloqueo de la PLC. La comparación del porcentaje de los efectos inhibitorios de la muscarina en ausencia y en presencia de los inhibidores se muestra en la figura 3C.

### **5.2.3 ¿Hay suficiente evidencia para involucrar a la vía G $_{q/11}$ / PLC/ DAG/PKC?**

Los resultados descritos sugieren que parte de la inhibición muscarínica está mediada por la activación de la PKC inducida por la activación de los receptores muscarínicos de tipo M $_1$ . Pero es claro que otra parte de la modulación muscarínica no ocurre a través de esta vía: PLC/DAG/PKC.

Sin embargo, la PKC puede ser activada independientemente de la PLC, como por ejemplo, por ciertas cinasas, como la cinasa de fosfoinosítidos 3 (PI3K), o por la TK (ver Introducción). Por lo que demostrar que la PLC está involucrada no quiere decir que sea esta enzima la que necesariamente nos lleve siempre a la activación de la PKC. Por su parte, la activación de la PLC puede involucrar a otras proteínas como a la PP-2B y la

CaM. Por lo tanto, para explorar qué tanto la activación de la PKC puede ser independiente de la PLC, en una serie de experimentos inhibimos a ambas enzimas



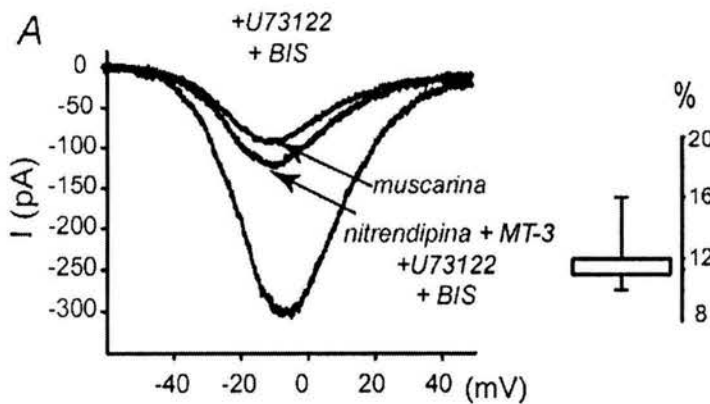
**Figura 3. La inhibición de la PKC reduce la modulación muscarínica de las corrientes Cav2 mediada por el receptor M<sub>1</sub>.**

A. La BIS (200 nM), inhibidor de la PKC, reduce la inhibición muscarínica de las corrientes Cav2. B. El péptido PKC 19-36 (50 μM), otro inhibidor de la PKC, también reduce la inhibición muscarínica de las corrientes Cav2. C. Resumen de los resultados donde se comparan los porcentajes medios de inhibición de la corriente de calcio. (P < 0.05, U de Mann Whitney). Las células se incubaron 20 min con la BIS. El péptido PKC 19-36 (50 μM) se disolvió en la solución intracelular.

al mismo tiempo: a la PLC y a la PKC, utilizando U73122 (10 μM) y BIS (200 nM) simultáneamente. Las células fueron incubadas alrededor de media hora con ambos inhibidores, y además el U73122 también se colocó en la pipeta de registro. En la figura 4A se muestra como la inhibición de la corriente de Ca<sup>2+</sup> mediada por la activación de los receptores muscarínicos M<sub>1</sub> se reduce de manera similar con ambas enzimas inhibidas:

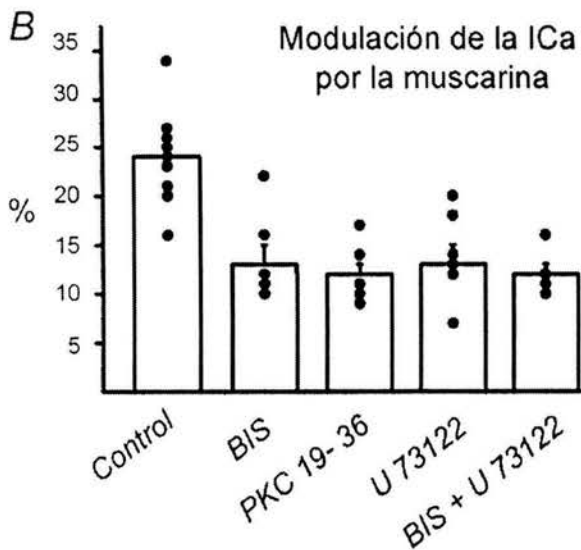
12 ± 1 % (n = 3), en comparación al caso en que una sola de ellas es inhibida: 13 ± 1 % (n = 7). Como los efectos de ambos inhibidores no fueron aditivos, los resultados sugieren que la actividad de PKC inducida por PLC es prácticamente toda la actividad PKC utilizada en la modulación.

Esto es, no hay lugar para la acción de PKC activada por otra vía. Aunque estos experimentos no descartan que en ciertas circunstancias los canales Ca<sub>v</sub>2 puedan ser modulados por actividad de PKC independiente de PLC, si sugieren que la PKC está siendo activada por el receptor muscarínico es a través de la vía de la PLC. Un resumen de los porcentajes de inhibición de la corriente de Ca<sup>2+</sup> producidos por la activación de los receptores muscarínicos M<sub>1</sub> se muestra en la figura 4B.



**Figure 4. Las reducciones de la corriente causadas por los inhibidores de la PLC y la PKC no son aditivas.**

A. La inhibición de la corriente de Ca<sup>2+</sup> a través del receptor muscarínico M<sub>1</sub> es reducida de manera similar en presencia conjunta de los inhibidores de la PLC y de la PKC, o por cada uno de los inhibidores por separado.



B. Gráfica de barras que muestra como los diferentes bloqueadores de la vía PLC/PKC produce el mismo nivel de bloqueo de la modulación muscarínica M<sub>1</sub>.

#### 5.2.4 Participación de una vía delimitada a membrana.

Varias de las acciones de los NT sobre los canales  $Ca_v2$  ocurren a través de una vía dependiente de voltaje y delimitada a membrana mediada por las proteínas  $G\beta\gamma$ . Por lo tanto también exploramos la participación de esta vía en las acciones muscarínicas. Un protocolo ampliamente utilizado en este tipo de experimentos es el de doble pulso (Fig. 5A, parte superior). Se dan dos pulsos o comandos de voltaje seguidos en el tiempo, cada uno activa una cierta cantidad de corriente antes y después de la muscarina. Sin embargo, el segundo pulso es precedido por un comando fuertemente despolarizante que llega a voltajes positivos. Estos voltajes impiden la unión de las proteínas  $G\beta\gamma$  al canal de calcio, y por tanto la inhibición que ellas median. Cuando hay inhibición mediada por esta vía, la corriente inducida por el segundo pulso de prueba es mucho mayor que la inducida por el primer pulso, puesto que durante el segundo pulso está inhibida la modulación debido a la despolarización precedente.

Como se muestra en la figura 5A el pulso despolarizante no revierte la inhibición muscarínica sobre la corriente de  $Ca^{2+}$ , lo que indica que los efectos muscarínicos no ocurren a través de una vía delimitada a membrana que sea dependiente de voltaje. En la figura 5B se muestra una comparación del porcentaje medio de facilitación de la corriente de  $Ca^{2+}$  en control ( $18 \pm 3 \%$ ), y en presencia de muscarina ( $15 \pm 3 \%$ ). No hubo diferencia significativa en la facilitación de la corriente de  $Ca^{2+}$  ( $n = 6$ ; NS, U de Mann Whitney).

Existe una inhibición tónica de las proteínas  $G\beta\gamma$  sobre los canales de calcio, ya que la despolarización a 80 mV revierte parte de la inhibición de la corriente de  $Ca^{2+}$ ; al comparar la amplitud de la corriente inducida por el primer y el segundo pulsos de prueba. Pero el mismo porcentaje de facilitación se obtiene con o sin muscarina (Fig. 5 A, B), lo que quiere decir que aún en la presencia de muscarina las proteínas  $G\beta\gamma$  ejercen una

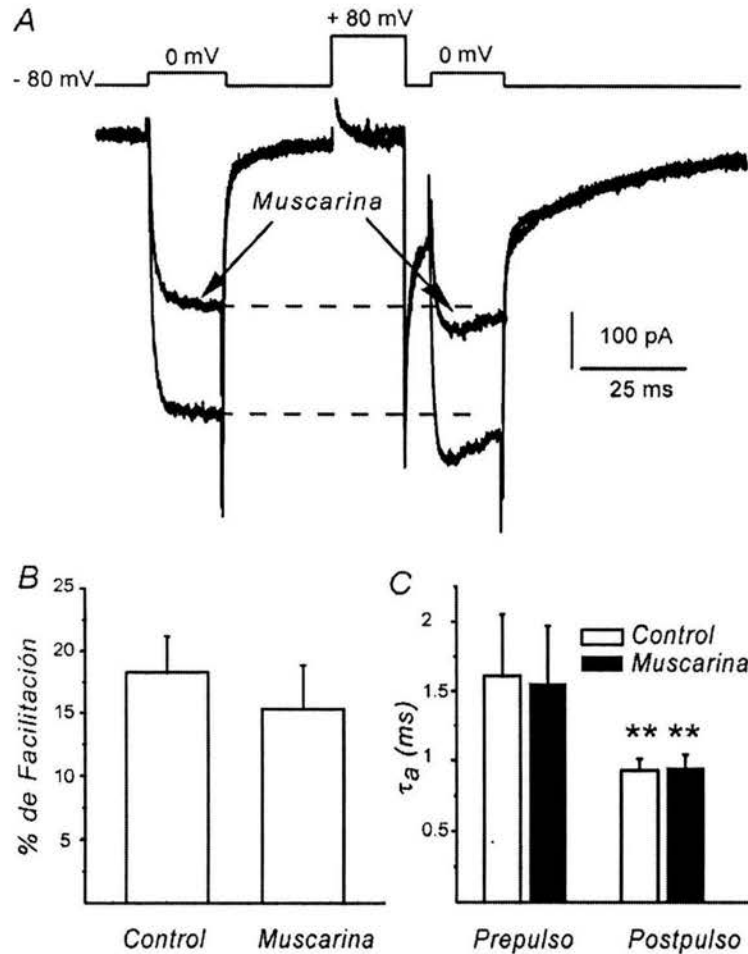


Figura 5. La mayor parte de las acciones muscarínicas sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  no dependen de voltaje. A. La magnitud de la inhibición muscarínica de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  no cambia después del prepulso despolarizante (+80 mV) que antecede al segundo pulso de prueba. B. El porcentaje medio de facilitación no cambia al aplicar muscarina. C. La aplicación de muscarina no cambia la constante media de activación antes y después del prepulso.

inhibición tónica sobre los canales. Esta inhibición por proteínas  $\text{G}\beta\gamma$  también se caracteriza por un enlentecimiento en la activación de los canales, el cual se revierte con los mismos pulsos despolarizantes.

Nótese como antes del prepulso se observa una activación lenta, con una constante de activación ( $\tau_a$ ) mayor, mientras que después del prepulso la activación es más rápida, y la  $\tau_a$  disminuye tanto en control como en presencia de muscarina (Fig 5A, B).



## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis mostramos que la activación de los receptores muscarínicos expresados en las neuronas espinosas medianas del neocórtex reduce la corriente de calcio dependiente de voltaje en estas células. El receptor muscarínico  $M_1$  fue identificado como el principal mediador de los efectos muscarínicos sobre la entrada de calcio dependiente de voltaje, incluyendo a la modulación de los canales de calcio  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , como blancos importantes de esta inhibición. Así mismo se encontró que gran parte de la modulación muscarínica de los canales  $Ca_v2.2$  es mediada por la vía clásica de la PLC. La modulación muscarínica de los canales  $Ca_v2$ , a través de la activación de los receptores  $M_1$ , involucró la fosforilación a través de la PKC.

Son varias las funciones celulares que dependen de los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , entre las cuales se encuentran la regulación de la frecuencia de disparo y la inhibición lateral entre las neuronas de proyección. Como era de esperarse, estas funciones fueron también moduladas por la activación del receptor  $M_1$ . Por lo tanto, el receptor  $M_1$  participa en el control de importantes funciones neuronales mediante la modulación de los canales de calcio activados por voltaje. Estos hallazgos no sólo aportan un avance en el entendimiento de la fisiología de los ganglios basales, sino que sugieren hipótesis para la comprensión de la fisiopatología del circuito, pues recordemos que como parte del cuadro de signos de la enfermedad de Parkinson está la hipercolinergia, a la que se le atribuye parte de la rigidez y el temblor en reposo, que hasta este momento se han intentado aliviar, sin mucho éxito, con antimuscarínicos poco selectivos. Así, esta tesis permite proponer una hipótesis clínica: que estos signos patológicos se verían mejor tratados si se usara un antagonista altamente selectivo para los receptores  $M_1$ .

## 6.1 Inhibición de la corriente de calcio total en las neuronas espinosas

### medianas

Ambos agonistas, la muscarina y el péptido MT- 1, producen una importante reducción de la corriente total de calcio activada por voltaje. La magnitud de la reducción coincide con la reportada en un trabajo previo (Howe y Surmeier 1995).

Las concentraciones utilizadas para ambos agonistas, muy posiblemente saturantes (Howe y Surmeier 1995, Jerusalinsky y Harvey 1994), reducen la corriente en un porcentaje similar:  $45 \pm 3 \%$  para la muscarina y  $42 \pm 6 \%$  para el MT- 1. Nuestros resultados indican que la mayor parte de la reducción de la corriente de calcio con ambos agonistas ocurre a través de la activación de los receptores  $M_1$ . La corriente de calcio  $Ca_v2$  que se obtuvo con el péptido MT- 1 fue similar en ausencia y en presencia del antagonista muscarínico  $M_4$ , el péptido MT- 3, lo que sugiere que la dosis de MT- 1 utilizada (48 nM) fue suficiente para obtener un efecto modulador cercano al máximo y predominantemente a través de los receptores  $M_1$ . La concentración de MT-1 utilizada es 2.5 veces mayor que la constante de afinidad obtenida en experimentos de desplazamiento de la pirenzepina en una preparación de sinaptosomas de cerebro: 19 nM (Jerusalinsky et al. 1992), pero justo por debajo de la concentración que comienza a afectar a los receptores  $M_4$ , en los cuales parece ser que actúa como antagonista y no como agonista (Jerusalinsky y Harvey 1994; Kornisiuk et al. 2001). Esto quiere decir que a las concentraciones utilizadas, el péptido MT-1 estaría actuando como agonista del receptor  $M_1$  y como antagonista del receptor  $M_4$ , lo que se refuerza por el hecho de que el porcentaje de modulación fue el mismo en ausencia y en presencia del antagonista específico para el receptor  $M_4$ , el péptido MT-3.

## 6.2 Participación del receptor $M_1$ en la modulación de la corriente de calcio de la familia $Ca_v1$ (L) en las neuronas espinosas medianas.

La aplicación de la nitrendipina, bloqueador de los canales  $Ca_v1$  (L), permitió confirmar que este canal es uno de los blancos de la inhibición muscarínica, y por otro lado, también reveló que la modulación muscarínica de los canales de calcio  $Ca_v2$  es prácticamente la mitad de toda la modulación. Estos resultados sólo concuerdan en parte con los obtenidos en el único trabajo previo sobre este tema, el de Howe y Surmeier (1995) donde se señala al canal de calcio  $Ca_v1$  (L) como el principal blanco de la modulación muscarínica. En esto coincidimos, pues el ajuste de nuestros datos a un sistema lineal de ecuaciones simultáneas (ver Vilchis et al. 2002) arroja casi un 70% de modulación muscarínica sobre el canal de tipo L. Recientemente se identificó al canal de tipo  $Ca_v1.3$ , de bajo voltaje de activación (se activa alrededor del umbral de disparo: -50 a -40 mV), como un importante componente de la corriente de tipo L en estas células (Olson et al. 2005). Ahora bien, si esta modulación sobre el canal de tipo L fuera la más importante, como sugieren Howe y Surmeier (1995), esperaríamos que la muscarina disminuyera la frecuencia de disparo ante el mismo estímulo (Perez-Garci et al. 2003). Pero esto no fue así, como muestran los presentes resultados, la muscarina *augmentó*, no *disminuyó*, la frecuencia de disparo. Lo cual nos lleva a pensar que, aunque los canales de tipo L son el principal blanco de la señalización activada por el receptor  $M_1$ , su reducción no es la principal modulación muscarínica de la corriente de calcio. Esto se debe en parte a que los canales de tipo L sólo representan alrededor del 20% de la corriente total. Mientras que juntos, los canales de tipo N y P/Q representan más del 50% de la corriente de calcio activada por voltaje.

La activación del receptor muscarínico  $M_1$  puede modular a la corriente de calcio  $Ca_v1$  (L) en neuronas centrales y periféricas (Bernheim et al. 1992; Shapiro et al. 1999; Stewart et

al. 1999); así como en sistemas de expresión donde se expresan juntos el receptor y el canal (Bannister et al. 2002, Kamatchi et al. 2001; Pemberton y Jones 1997).

### **6.3 Modulación muscarínica de la corriente de calcio $Ca_v2$ en las neuronas espinosas medianas por la activación del receptor muscarínico $M_1$ .**

En contraste con los resultados de Howe y Surmeier (1995), nuestros resultados demuestran que la mayor modulación de la corriente de calcio activada por voltaje se da sobre los canales  $Ca_v2$ , pues aunque la modulación de los canales de tipo  $Ca_v1$  sea de 70% el hecho de que estos canales sólo constituyan el 22% de la corriente total arroja un porcentaje de modulación de alrededor de un 15%. Mientras que aunque la modulación de los canales de tipo  $Ca_v2$  es sólo de un 23 % para los P/Q ( $Ca_v2.1$ ) y de un 27% para los N ( $Ca_v2.2$ ), la suma da un 50% de modulación sobre dos corrientes que constituyen el 53% de la corriente total, esto es, alrededor de un 27% de modulación (la media experimental fue el 29%) sobre la corriente de calcio. Nótese que juntas, la modulación de los canales  $Ca_v1$  y  $Ca_v2$  suman el más de 40% de modulación de la corriente de calcio que produce la muscarina, por lo que la modulación  $Ca_v2$  es 1.4 veces más grande que la modulación  $Ca_v1$ ; esto tiene importantes consecuencias funcionales como se verá a continuación.

Las toxinas muscarínicas MT-3 y MT-7 (Karlsson et al. 2000; Potter et al. 2004), que usamos en nuestros experimentos, son antagonistas altamente específicos de los receptores muscarínicos  $M_4$  y  $M_1$ , respectivamente. De hecho son los únicos antagonistas específicos reconocidos hasta la fecha (Caulfield y Birdsall 1998). La toxina MT-7 muestra hasta 10,000 veces más afinidad por el receptor  $M_1$  que por el resto de los receptores muscarínicos, mientras que la toxina MT-3 presenta 100 veces más afinidad por el receptor  $M_4$  que por el  $M_1$  (Caulfield y Birdsall 1998; Karlsson et al. 2000; Potter et al. 2004).

Debido a que en el neostriado se colocan ambos receptores en muchas neuronas (Bernard et al. 1992; Hersh y Levey 1995; Yan et al. 2001), estas toxinas se han empleado en varios estudios funcionales en este núcleo, demostrándose su alta especificidad (Olianas et al. 1996; Olianas et al. 1998; Potter et al. 2004). Por ejemplo, el empleo de ambas toxinas, sirvió para mostrar la expresión preferencial del receptor  $M_4$  en las neuronas estriatonigrales de la vía directa (Potter et al. 2004). Asimismo, la habilidad de la toxina MT-7 para bloquear de forma irreversible los receptores  $M_1$  en el neostriado, por dos días, en vivo, permitió el desarrollo de un nuevo modelo para el estudio del papel de los receptores muscarínicos  $M_1$  y  $M_4$  en el control del movimiento (Potter et al. 2004).

Nuestros experimentos demostraron que en presencia del péptido MT-7, antagonista específico de los receptores muscarínicos  $M_1$ , gran parte de la modulación muscarínica fue bloqueada. Al revés, en presencia del péptido MT-3, antagonista específico de los receptores muscarínicos  $M_4$ , gran parte de la modulación muscarínica de la corriente de calcio se mantuvo. Esto no descarta que no esté presente ninguna modulación mediada por el receptor  $M_4$ , pero sí apunta a que la modulación mediada por el receptor  $M_1$  es, con mucho, la más importante en lo que respecta al influjo de calcio activado por voltaje. Por último, el péptido MT-1, agonista selectivo de los receptores  $M_1$  a las concentraciones utilizadas, redujo la corriente en la misma medida en que lo hizo la muscarina, aun en presencia del antagonista específico de los receptores  $M_4$ , el péptido MT-7. Estos resultados demuestran de manera concluyente la importancia del receptor muscarínico  $M_1$  en la modulación de la corriente de calcio de los tipos  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ . Una última acotación obtenida de estos resultados es que se descarta la modulación muscarínica  $M_1$  de los canales de tipo R ( $Ca_v2.3$ ). ¿Serán ellos el blanco modulador de los receptores  $M_4$ ? El receptor muscarínico  $M_4$  podría ser responsable de la modulación de corrientes entrantes persistentes, catiónicas o de sodio, en estas células (Figuroa et al. 2002 y resultados del laboratorio no publicados).

En el estriado se encuentran altos niveles de expresión del RNAm para el receptor  $M_1$ , en prácticamente todas las células, mientras que el receptor  $M_4$  se expresa de manera preferencial en las neuronas que expresan sustancia P y sus niveles de expresión son más bajos que los encontrados para el receptor  $M_1$  (Yan et al. 2001). Estos resultados han sido confirmados con los de detección de la proteína de los receptores utilizando técnicas de inmunocitoquímica; encontrándose que el receptor  $M_1$  está en un 80 % de las neuronas espinosas, mientras que el receptor  $M_4$  está sólo en alrededor de un 40 % de las mismas (Hersch y Levey 1995).

Antes de este trabajo, las únicas neuronas nativas en las que se había reportado una modulación de las corrientes de calcio de la familia  $Ca_v2$ , mediada por el receptor muscarínico  $M_1$ , eran las neuronas simpáticas de rata y ratón (Bernheim et al. 1992; Liu y Rittenhouse 2003; Shapiro et al. 1999). La posibilidad de que esta modulación existiese, había sin embargo sido sugerida por estudios en la línea celular HEK 293 (Melliti et al. 2001). Asimismo, se ha sugerido la participación del receptor  $M_1$  en la modulación de las corrientes  $Ca_v2$  en neuronas corticales, aunque no se ha probado esta hipótesis con estudios farmacológicos.

#### **6.4 Implicaciones funcionales de la modulación muscarínica $M_1$ sobre los canales de la familia $Ca_v2$ en las neuronas estriatales de proyección.**

Las neuronas espinosas medianas o de proyección del neostriado llevan la salida del neostriado hacia el resto de los ganglios basales. Esta salida es el resultado de las computaciones que el neostriado realiza sobre los comandos y planes motores generados en las cortezas motoras y premotoras. De esta salida entonces depende la ejecución correcta de las tareas motoras voluntarias. Además, el circuito formado por estas neuronas y sus interneuronas guarda la memoria de procedimientos, esto es, los programas motores

aprendidos tales como escribir, tocar un instrumento musical, manejar un auto, etc. (Hikosaka et al. 1999; Miyachi et al. 2002). Así, el funcionamiento de estas neuronas es crucial para el sistema motor en su conjunto. Estas neuronas expresan diferentes tipos de canal de calcio de la familia  $Ca_v2$  (Bargas et al. 1994, Foehring et al. 2000; Mermelstein. 1999). Estos canales regulan la excitabilidad de estas neuronas (Perez-Garci et al. 2003), y por lo tanto, la salida del neocórtex y la conducta motora.

Tanto la  $\omega$ -agatoxinaTK (Teramoto et al. 1997) como la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Tsien et al. 1995), son los bloqueadores específicos de los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , respectivamente. Las concentraciones empleadas en nuestros experimentos fueron saturantes, garantizando el bloqueo total de estos canales cuando esto se requería (Bargas et al. 1994).

El uso de antagonistas selectivos de los canales de calcio como del antagonista de los receptores muscarínicos  $M_4$ , el péptido MT-3, nos permitió identificar a los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  como blancos de la modulación muscarínica  $M_1$ .

No sólo eso, pudimos cuantificar esta modulación (ver arriba) y llegar a la conclusión de que en las neuronas espinosas es más importante que la ejercida sobre los canales  $Ca_v1$ . ¿Cuál es la importancia de esta modulación? Se ha demostrado que el bloqueo de los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  aumenta la excitabilidad de las neuronas estriatales de proyección, efecto radicalmente contrario al efecto de bloquear los canales  $Ca_v1$ , que reduce la excitabilidad (Perez-Garci et al. 2003). Esto demuestra que los canales de calcio de las neuronas están especializados en participar en tareas específicas. Más aún, aunque ambas clases de canal,  $Ca_v2$  y  $Ca_v1$  producen corriente entrante, sus efectos sobre el disparo son opuestos.

La razón de esto es que el calcio que entra por los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  activa a los canales de potasio dependientes de calcio ( $I_{K(Ca^{2+})}$ ) (Vilchis et al. 2002). A su vez, los canales de potasio dependientes de calcio contribuyen a generar el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que participa en la regulación del intervalo entre las espigas y por lo

tanto en la fijación de la frecuencia de disparo como respuesta a los estímulos en estas células (Pineda et al. 1992). Así, al bloquearse la entrada de calcio por los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , deja de activarse la  $I_{K(Ca^{2+})}$  lo que reduce el PPH y el intervalo entre dos potenciales de acción, lo que aumenta la frecuencia de disparo. Este es el mecanismo mediante el cual el bloqueo de una corriente entrante puede incrementar la excitabilidad.

Curiosamente, sin embargo, el bloqueo de uno solo de estos canales,  $Ca_v2.1$  o  $Ca_v2.2$ , no afecta al PPH ni produce un aumento de la frecuencia de disparo. Es necesario que ambos canales de calcio sean bloqueados al mismo tiempo para que ocurra un aumento significativo de la frecuencia de disparo en la mayoría de estas neuronas (Perez-Garci et al. 2003). Así, como la activación del receptor  $M_1$  reduce la corriente que pasa por ambos canales,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , la acetilcolina es capaz de reducir el PPH y aumentar la frecuencia de disparo para un mismo estímulo (Pineda et al. 1995; Perez-Rosello et al. 2004). Este mecanismo se vió validado al ser bloqueados los efectos colinérgicos sobre el PPH y la frecuencia por el péptido MT-7. Estos hallazgos no descartan una acción muscarínica directa sobre los canales de potasio dependientes de calcio, pero el hecho de que se necesite bloquear ambos canales de calcio para que el PPH sufra un cambio sugiere que gran parte, sino es que todos los efectos muscarínicos sobre el PPH, son mediados a través de la reducción de la entrada de calcio por los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ .

Otras neuronas en las que la activación de receptores muscarínicos, posiblemente  $M_1$ , regula el PPH son: neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (Scroggs et al. 2001), neuronas de la corteza, el subículo y de la amígdala basolateral (Cox et al. 1994; Kawasaki et al. 1999; Womble y Moises 1993). En ninguno de estos se conoce con certeza qué receptores muscarínicos median estos efectos. En todos estos casos lo que si se sugiere es que la ACh actuá indirectamente para reducir el postpotencial, esto es, a través de la inhibición de los canales de calcio como en las NEMs. Como se discute en los resultados (ver artículo adjunto en los Resultados), basta una inhibición parcial de ambos



canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , para que se reduzca el PPH. Ahora bien, lo importante de esta cooperación en la activación del postpotencial, y por ende, en determinar la frecuencia de disparo de las NEMs refuerza la idea de que en las NEMs, al igual que en otras células (Marrion y Tavalin 1998, Xia et al. 1998), los canales de calcio se encuentran formando un complejo funcional con los canales de potasio dependientes de calcio. En este caso, ambos canales,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , formarían parte de este complejo.

Otra de las funciones celulares del calcio que entra por los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  es la liberación de GABA de las terminales sinápticas de las NEMs (Tecuapetla et al. 2005). Si los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  de las terminales sinápticas son los mismos que los de la membrana somatodendrítica, y los receptores muscarínicos  $M_1$  también se expresan en estas terminales; entonces, la activación de estos receptores debe de provocar la inhibición presináptica de la liberación de GABA al reducir la entrada de calcio por los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ . Esto se comprobó en nuestro laboratorio, y forma parte de los resultados del artículo donde se presentan parte de los resultados de la presente tesis.

La inhibición muscarínica de la liberación de GABA de las terminales de las NEMs había sido sugerida por estudios de liberación en sinaptosomas, en rebanadas estriatales, y en estudios de microdiálisis (Kuriyama et al. 1984; Smolders et al. 1997; Raiteri et al. 1990). También los potenciales de campo gabaérgicos registrados en el estriado son inhibidos por la activación de los receptores muscarínicos presumiblemente  $M_1$  (Sugita et al. 1991). Una modulación de la liberación de GABA, mediada a través de receptores muscarínicos  $M_1$ , también ha sido encontrada en corteza, amígdala, núcleo acumbens, y colículo superior (Hashimoto et al. 1994; Kimura and Baughman, 1997; Li et al. 2004; Sugita et al. 1991).

¿Por qué la acetilcolina inhibe a ambos tipos de canal para reducir la liberación de GABA? Aquí, al contrario de lo que sucede con el PPH, bastaría bloquear uno de los dos para que la liberación se reduzca. Sin embargo, los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  pueden ser

facilitados en diferente magnitud por los trenes de potenciales de acción (Currie y Fox 2002) debido a sus diferentes propiedades biofísicas. Esto influye en el tipo de plasticidad sináptica que las terminales pueden expresar (Poncer et al. 2000). Así, los canales  $Ca_v2.1$  presentan mayor facilitación dependiente de frecuencia que los  $Ca_v2.2$ , lo que eliminaría la inhibición presináptica de algunas terminales de manera diferencial. Además, estos canales de calcio presentan diferente localización alrededor de los sitios de liberación (Wu et al. 1999). Así, al inhibir a los dos tipos de canales de calcio a través de la activación de los receptores  $M_1$ , la acetilcolina aseguraría una inhibición de la liberación de GABA (Hefft et al. 2002)

Podemos concluir que la acetilcolina, a través de sus acciones sobre los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , produce una facilitación de la frecuencia de disparo de las NEMs, y una reducción de la inhibición lateral entre estas neuronas. La activación del receptor  $M_1$  también media importantes acciones facilitatorias en el rango subumbral (Hsu et al. 1996; Figueroa et al. 2002) y potencia las respuestas dependientes de NMDA (Calabresi et al. 2000). De esta forma, la activación colinérgica de los receptores muscarínicos  $M_1$  producirá un incremento en el reclutamiento de las NEMs.

## **6.5 Vía de señalización del receptor $M_1$**

Nuestros resultados indican, que una buena parte de la modulación de los canales de calcio de la familia  $Ca_v2$ , por la activación de los receptores muscarínicos de tipo  $M_1$  en las neuronas estriatales de proyección, ocurre a través de la vía clásica de la PLC asociada a estos receptores. También aportamos evidencia de que unos de los elementos que está participando es la PKC. Esta conclusión se debe a que los inhibidores de la PLC y la PKC que empleamos son bastantes específicos a las concentraciones utilizadas y ambos prácticamente bloquearon el efecto muscarínico. Sin embargo, a pesar de que se usaron

dosis saturantes para inactivar a la PLC y/o la PKC, una fracción de la modulación muscarínica persistió sugiriendo que una parte de las acciones muscarínicas ocurren a través de otra vía de señalización.

En muchas células, los receptores de la clase  $M_1$  se acoplan a la vía de la PLC/IP3-DAG/PKC (Caulfield y Birsall 1998). Sin embargo, la única vía que ha sido propuesta en las neuronas estriatales de proyección para explicar las acciones del receptor  $M_1$  es la vía de la PLC pero asociada a la activación de calcineurina vía la activación de la calcio-calmodulina (Rakhilin et al. 2004). Además, sólo existe un reporte previo en neuronas simpáticas donde se describe que la vía utilizada por el receptor  $M_1$  para modular a los canales de calcio  $Ca_v2$  involucra a la PLC (Gamper et al. 2004). En estas neuronas se encontró que la hidrólisis del  $PIP_2$  provocada por la activación de la PLC inhibe la amplitud de la corriente de calcio a través del canal  $Ca_v2.2$  (N). Lo que sugiere que la actividad del canal de calcio está regulada por los niveles de fosfoinosítidos y no el DAG ni por la PKC misma (Gamper et al. 2004). Así, en lo que respecta a los canales de calcio  $Ca_v2$ , no existe ningún reporte previo donde esta cinasa esté involucrada en los efectos moduladores desencadenados por la activación del receptor  $M_1$ . En este punto debemos tener en cuenta que en muchas de las células en las cuales el receptor pudiera estar implicado en la modulación de las corrientes de calcio (Scroggs et al. 2001; Stewart et al. 1999; Zhu y Yakel 1997), no se ha determinado aun si la PLC o la PKC están siendo activadas. Por lo que realmente pudiera ser mayor el número de células en donde este mecanismo tiene lugar.

La modulación remanente después de bloquear a la PKC y la PLC, sugiere que aparte de la PLC está siendo encendida otra vía al activarse el receptor  $M_1$ . ¿Cuál podría ser? una posible candidata es la vía de la  $PLA_2$ , que en neuronas simpáticas inhibe al canal  $Ca_v2.2$  a través de la producción de AA (Liu y Rittenhouse 2003). Otra vía que pudiera estar implicada es la de la PLD. Esta puede ser activada por los receptores muscarínicos de la clase  $M_1$  independientemente de la activación de la PLC y la PKC (Mitchell et al. 2003; Rumenapp et

al. 2001). Aunque sólo existe un reporte que sugiere que la PLD está participando en la inhibición de un canal de calcio (Unno et al. 1998). Los canales de calcio también pueden ser inhibidos mediante la fosforilación directa por tirosinas cinasas (Weiss y Burgoyne 2001), por lo que esta pudiera ser otra de las vías responsable de la modulación muscarínica independiente de la PLC. Las tirosinas cinasas pueden ser activadas directamente por las proteínas  $G_q$  (Bence et al. 1997) e independientemente de la PKC (Lanzafame et al. 2003)

Una hipótesis que no pudo ser comprobada, pero tampoco totalmente descartada en el presente trabajo es que cada canal de calcio,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , pudiera estar siendo modulado mediante una vía de señalización intracelular diferente aunque ambas arranquen con la activación del receptor  $M_1$ . Esto explicaría porqué sólo una parte de la inhibición fue bloqueada por los inhibidores de la PLC y de la PKC. Esto no es un planteamiento nuevo ya que se ha visto en muchas células que incluso un mismo canal puede ser modulado por mecanismos diferentes de manera simultánea (Diverse-Pierluissi et al. 1995; Hille 1994).

## 6.6 Conclusiones

El presente trabajo de Tesis nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) El receptor muscarínico  $M_1$  es el principal responsable de la modulación muscarínica de las corrientes de calcio en las neuronas espinosas medianas de proyección. En consecuencia, las funciones celulares que dependen de estos canales (el disparo y la liberación del NT) también son reguladas por la activación de este receptor.
- 2) A excepción de los canales de calcio  $Ca_v2.3$  (R), todos los demás canales de calcio expresados en estas células ( $Ca_v1$ ,  $Ca_v2.1$ , y  $Ca_v2.2$ ) son blanco de las acciones colinérgicas al activarse el receptor  $M_1$ .
- 3) Aunque el canal de calcio tipo L ( $Ca_v1$ ) es el principal blanco de las acciones

muscarínicas mediadas por la activación del receptor  $M_1$ , la modulación conjunta de ambos canales,  $Ca_v2.1$  (P/Q) y  $Ca_v2.2$  (N), conlleva a que la regulación de las funciones que dependen de estos canales adquiriera una mayor relevancia funcional. Esto provoca un incremento en la excitabilidad neuronal como consecuencia de la reducción del PPH, el cual depende de la activación de ambos canales.

- 4) La activación del receptor muscarínico  $M_1$  disminuye la inhibición lateral entre las neuronas espinosas medianas de proyección, al reducir presinápticamente la liberación de GABA de las colaterales axónicas. El mecanismo celular que usa la acetilcolina para lograr esto es, al igual que en soma, la reducción de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de ambos canales,  $Ca_v2.1$ (P/Q) y  $Ca_v2.2$  (N).
- 5) Los receptores muscarínicos  $M_1$  en las neuronas espinosas medianas se acoplan a la vía clásica  $G_q/PLC/DAG/PKC$  para producir parte de las acciones modulatorias sobre los canales  $Ca_v2$ .

## 6.7 Sumario

Mediante la modulación de los canales de calcio  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , a través de la activación del receptor muscarínico  $M_1$ , la acetilcolina regula la frecuencia de disparo de las neuronas espinosas medianas, así como de la inhibición lateral entre las mismas. Ambas funciones determinan la excitabilidad de las neuronas espinosas medianas, y por ende, la salida hacia sus núcleos blancos. Así, en condiciones fisiológicas donde exista un mayor tono colinérgico, las acciones colinérgicas a través de los receptores  $M_1$  podrían ser determinantes en el procesamiento de la información que sale del neostriado hacia los núcleos de salida de los ganglios basales.

## 6.8 Perspectivas

Aunque con este trabajo avanzamos en el conocimiento de las acciones muscarínicas en el neostriado varios son los aspectos de crucial interés que quedan por estudiar con respecto a las acciones mediadas por la acetilcolina en este núcleo. En cuanto a los receptores muscarínicos se necesita profundizar en el estudio de las acciones del receptor  $M_4$  sobre la conductancia catiónica presente en estas células. Otro de los puntos que no terminaron de estudiarse es la vía de señalización responsable de la otra parte de los efectos muscarínicos  $M_1$  sobre los canales de calcio  $Ca_v2$ . Teniendo en cuenta que la neurona espinosa mediana es uno de los substratos donde ocurre la interacción de los neuromoduladores ACh y DA sería de gran interés estudiar cómo se está dando esta interacción. ¿Cuales serían las acciones neuromoduladoras de la ACh sobre el “*up-state*” y “*down-state*” al activar a los receptores muscarínicos?. Otra pregunta interesante sería estudiar que hace la muscarina sobre la red neuronal estriatal. ¿Si recluta la acetilcolina un mayor número de neuronas?. Por último, de gran importancia sería evaluar los efectos de un antimuscarínico  $M_1$  en modelos de la enfermedad de Parkinson para ver si puede ser utilizado en el tratamiento de este desorden motor.

## BIBLIOGRAFIA

- Akins PT, Surmeier DJ, Kitai ST.** Muscarinic modulation of a transient K<sup>+</sup> conductance in rat neostriatal neurons. *Nature* 344: 240-242, 1990.
- Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS.** Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J Comp Neurol* 434:445-460, 2001.
- Allen TG, Brown DA.** M2 muscarinic receptor-mediated inhibition of the Ca<sup>2+</sup> current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. *J Physiol* 466: 173-89, 1993.
- Aosaki T, Kimura M, Graybiel AM.** Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J Neurophysiol* 73:1234-1252, 1995.
- Apicella P.** Tonicly active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events. *Eur J Neurosci* 16:2017-2026, 2002.
- Bannister RA, Melliti K, Adams BA.** Differential modulation of CaV2.3 Ca<sup>2+</sup> channels by Galphaq/11-coupled muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 65:381-388, 2004.
- Bannister RA, Melliti K, Adams BA.** Reconstituted slow muscarinic inhibition of neuronal (Ca(v)1.2c) L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* 83:3256-3267, 2002.
- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E.** Ca<sup>2+</sup> - activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88: 479-488, 1999.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ.** Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely-isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14: 6667-6686, 1994.
- Bargas J, Galarraga E, Aceves J.** An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 75(1):146-156, 1989.
- Beech DJ, Bernheim L, Hille B.** Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron* 8:97-106, 1992.
- Belmeguenai A, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Louiset E.** Neurotensin modulates the amplitude and frequency of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in frog pituitary melanotrophs: implication of the inositol triphosphate/protein kinase C pathway. *Eur J Neurosci* 16:1907-1916, 2002.
- Bence K, Ma W, Kozasa T, Huang XY.** Direct stimulation of Bruton's tyrosine kinase by G(q)-protein alpha-subunit. *Nature* 389:296-299, 1997.
- Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ.** Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20:8493-8503, 2000.
- Bennett BD, Wilson CJ.** Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci* 19:5586-5596, 1999.
- Bernard V, Normand E, Bloch B.** Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci* 12: 3591-3600, 1992.
- Bernheim L, Mathie A, Hille B.** Characterization of muscarinic receptors subtypes inhibiting Ca<sup>2+</sup>

current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9544-9548, 1992.

**Boixel C, Tessier S, Pansard Y, Lang-Lazdunski L, Mercadier JJ, Hatem SN.** Tyrosine kinase and protein kinase C regulate L-type Ca(2+) current cooperatively in human atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H670-H676, 2000.

**Bonner TI.** The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* 12: 148-151, 1989.

**Brose N, Rosenmund C.** Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115(Pt 23):4399-4411, 2002.

**Brown DA, Abogadie FC, Allen TG, Buckley NJ, Caulfield MP, Delmas P, Haley JE, Lamas JA, Selyanko AA.** Muscarinic mechanisms in nerve cells. *Life Sci* 60:1137-1144, 1997.

**Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G.** Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23: 120-126, 2000.

**Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G.** Endogenous Ach enhances striatal NMDA-responses via M1-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci* 10: 2887-2895, 1998.

**Callaghan B, Koh SD, Keef KD.** Muscarinic M2 receptor stimulation of Cav1.2b requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and c-Src. *Circ Res* 94:626-633, 2004.

**Cantrell AR, Carter-Russell H, Mermelstein P, Surmeier DJ.** Ca and Na currents in acutely isolated neostriatal neurons from the rat. In: *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function* (Ariano MA; Surmeier DJ, eds), pp 151-163. Landes: Austin, 1995.

**Catterall WA.** Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555, 2000.

**Caulfield MP, Birdsall NJM.** International Union Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279-290, 1998.

**Cheng TH, Chang CY, Wei J, Lin CI.** Effects of endothelin 1 on calcium and sodium currents in isolated human cardiac myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1774-1783, 1995.

**Cox CL, Metherate R, Ashe JH.** Modulation of cellular excitability in neocortex: muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine. *Synapse* 16:123-136, 1994.

**Cuevas J, Adams DJ.** M<sub>4</sub> muscarinic receptor activation modulates calcium channel currents in rat intracardiac neurons. *J Neurophysiol* 78: 1903-1912, 1997.

**Currie KP, Fox AP.** Differential facilitation of N- and P/Q-type calcium channels during trains of action potential-like waveforms. *J Physiol* 539(Pt 2): 419-31, 2002.

**Dani JA.** Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166-74, 2001.

**Delmas P, Crest M, Brown DA.** Functional organization of PLC signaling microdomains in neurons. *Trends Neurosci* 27:41-47, 2004.

**Delmas P, Abogadie FC, Dayrell M, Haley JE, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA, Buckley NJ.** G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-type calcium currents in sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 10:1654-1666, 1998.



- De Vente J.** cGMP: a second messenger for acetylcholine in the brain? *Neurochem Int* 45:799-812, 2004.
- Di Chiara G, Morelli M, Consolo S.** Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* 17:228-233, 1994.
- Diverse-Pierluissi M, Goldsmith PK, Dunlap K.** Transmitter-mediated inhibition of N-type calcium channels in sensory neurons involves multiple GTP-binding proteins and subunits. *Neuron* 14:191-200, 1995.
- Doering CJ, Zamponi GW.** Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505, 2003.
- Eglen RM, Choppin A, Watson N.** Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 22:409-414, 2001.
- Felder CC.** Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB* 9:619-625, 1995.
- Figuroa A, Galarraga E, Bargas J.** Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46: 215-223, 2002.
- Flores-Hernández J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J.** Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J Neurophysiol* 72:2246-2256, 1994.
- Foehring RC, Mermelstein PG, Song WJ, Ulrich S, Surmeier DJ.** Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 84: 2225-2236, 2000.
- Gabel LA, Nisenbaum ES.** Muscarinic receptors differentially modulate the persistent potassium current in striatal spiny neurons. *J Neurophysiol* 81: 1418-1423, 1999.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J.** Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19: 3629-3638, 1999.
- Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 24:10980-10992, 2004.
- Gerfen CR and Wilson CJ.** The basal ganglia. In *Handbook of Chemical Anatomy, Integrated Systems in the CNS, Part III* Edited by Swanson LW. et al. Elsevier, 371-468, 1996.
- Gomez AM, Kerfant BG, Vassort G, Pappano AJ.** Autonomic regulation of calcium and potassium channels is oppositely modulated by microtubules in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H2065-H2071, 2004.
- Graybiel AM.** Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 133-154, 1990.
- Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J.** Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23: 8931-8940, 2003.
- Harsing LG, Zigmond MJ.** Postsynaptic integration of cholinergic and dopaminergic signals on medium-sized GABAergic projection neurons in the neostriatum. *Brain Research Bulletin* 45: 607-

613, 1998.

**Harvey RD, Belevych AE.** Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br J Pharmacol* 139:1074-1084, 2003.

**Hashimoto T, Shu H, Kuriyama K.** Muscarinic M1 receptor mediated inhibition of GABA release from rat cerebral cortex. Muscarinic M1 receptor mediated inhibition of GABA release from rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 24:389-394, 1994.

**He JQ, Pi Y, Walker JW, Kamp TJ.** Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type  $Ca^{2+}$  current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 524 Pt 3:807-20, 2000.

**Hefft S, Kraushaar U, Geiger JR, Jonas P.** Presynaptic short-term depression is maintained during regulation of transmitter release at a GABAergic synapse in rat hippocampus. *J Physiol* 539(Pt 1):201-208, 2002.

**Hernandez-Echeagaray E, Galarraga E, Bargas J.** 3-Alpha-chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37:1493-1502, 1998.

**Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E.** D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny by modulating an L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *J. Neurosci* 17, 3334-3342, 1997.

**Hersh SM, Levey AI.** Diverse pre- and post-synaptic expression of m1-m4 muscarinic receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. *Life Sci* 56: 931-938, 1995.

**Hikosaka O, Nakahara H, Rand MK, Sakai K, Lu X, Nakamura K, Miyachi S, Doya K.** Parallel neural networks for learning sequential procedures. *Trends Neurosci* 22:464-471, 1999.

**Hille B.** Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531-536, 1994.

**Howe AR, Surmeier JD.** Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type  $Ca^{2+}$  currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15: 458-469, 1995.

**Hsu KS, Yang CH, Huang CC, Gean PW.** Carbachol induces current in neostriatal neurons through M1-like muscarinic receptors. *Neuroscience* 73: 751-760, 1996.

**Jerusalinsky D, Harvey AL.** Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 15: 424-433, 1994.

**Jerusalinsky D, Cervenasky C, Pena C, Raskovsky S, Dajas F.** Two polypeptides from *Dendroaspis angusticeps* venom selectively inhibit the binding of central muscarinic cholinergic receptor ligands. *Neurochem Int* 20:237-246, 1992.

**Jin X, Morsy N, Shoeb F, Zavzavadjian J, Akbarali HI.** Coupling of M2 muscarinic receptor to L-type Ca channel via c-src kinase in rabbit colonic circular smooth muscle. *Gastroenterology* 123:827-834, 2002.

**Jones SVP.** Muscarinic receptors subtypes: modulation of ion channels. *Life Sci* 52: 457-464, 1993.

**Jones SW, Elmslie KS.** Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Membr Biol* 155:1-10, 1997.

- Kawaguchi Y.** Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res* 27:1-8, 1997.
- Kamatchi GL, Franke R, Lynch C 3rd, Sando JJ.** Identification of sites responsible for potentiation of type 2.3 calcium currents by acetyl-beta-methylcholine. *J Biol Chem* 279:4102-4109, 2004.
- Kamatchi GL, Tiwari SN, Chan CK, Chen D, Do SH, Durieux ME, Lynch C 3rd.** Distinct regulation of expressed calcium channels 2.3 in *Xenopus* oocytes by direct or indirect activation of protein kinase C. *Brain Res* 968:227-233, 2003.
- Kamatchi GL, Durieux ME, Lynch C 3rd.** Differential sensitivity of expressed L-type calcium channels and muscarinic M(1) receptors to volatile anesthetics in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 297:981-990, 2001.
- Kammermeier PJ, Ruiz-Velasco V, Ikeda SR.** A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. *J Neurosci* 20:5623-5629, 2000.
- Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P, Adem A.** Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82:793-806, 2000.
- Kawasaki H, Palmieri C, Avoli M.** Muscarinic receptor activation induces depolarizing plateau potentials in bursting neurons of the rat subiculum. *J Neurophysiol* 82:2590-601, 1999.
- Kelso E, Spiers P, McDermott B, Scholfield N, Silke B.** Dual effects of endothelin-1 on the L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 308:351-355, 1996.
- Kimura F, Baughman RW.** Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77: 709-16, 1997.
- Kornisiuk E, Sanchez G, Cerveñansky C, Duran R, Jerusalinsky D.** Muscarinic toxins and their actions on muscarinic inhibition of adenylyl cyclase activity. *J Neurochem* 78(Suppl 1):BP18-BP37, 2001.
- Krnjevic K.** Synaptic mechanisms modulated by acetylcholine in cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145:81-93, 2004.
- Kuriyama K, Kanmori K, Taguchi J, Yoneda Y.** Stress-induced enhancement of suppression of [<sup>3</sup>H]GABA release from striatal slices by presynaptic autoreceptor. *J Neurochem* 42: 943-950, 1984.
- Lacerde AE, Rampe D, Brown AM.** Effects of protein kinase C activators on cardiac Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 335:249-251, 1988.
- Lanzafame AA, Christopoulos A, Mitchelson F.** Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* 9:241-260, 2003.
- Levey AI.** Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* 52: 441-448, 1993.
- Levine RR, Birdsall NJM, Nathanson NM.** Proceedings of the ninth International Symposium on Subtypes of Muscarinic Receptors. *Life Sci.* 68:2449-2642, 2001.
- Li F, Endo T, Isa T.** Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors suppress GABAergic synaptic transmission in the intermediate grey layer of mouse superior colliculus. *Eur J Neurosci* 20:2079-2088, 2004.

- Liu L, Rittenhouse AR.** Arachidonic acid mediates muscarinic inhibition and enhancement of N-type Ca<sup>2+</sup> current in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:295-300, 2003.
- Love JA, Richards NW, Owyang C, Dawson DC.** Muscarinic modulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting HIT-T15 cells. *Am J Physiol* 274(2 Pt 1):G397-405, 1998.
- Maeno-Hikichi Y, Chang S, Matsumura K, Lai M, Lin H, Nakagawa N, Kuroda S, Zhang JF.** A PKC epsilon-ENH-channel complex specifically modulates N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nat Neurosci* 6:468-475, 2003.
- Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT, Conn PJ.** Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11465-11470, 1998.
- Marrion NV, Tavalin SJ.** Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons. *Nature* 395:900-905, 1998.
- Marx S.** Ion channel macromolecular complexes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 35:37-44, 2003.
- Melliti K, Meza U, Adams BA.** RGS2 blocks slow muscarinic inhibition of N-type Ca(2+) channels reconstituted in a human cell line. *J Physiol* 532(Pt 2):337-347, 2001.
- Melliti K, Meza U, Adams B.** Muscarinic stimulation of alpha1E Ca channels is selectively blocked by the effector antagonist function of RGS2 and phospholipase C-beta1. *J Neurosci* 20:7167-7173, 2000.
- Mermelstein PG, Foehring RC, Tkatch T, Song WJ, Baranauskas G, Surmeier DJ.** Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with beta subunit expression. *J Neurosci* 19:7268-7277, 1999.
- Middleton FA, Strick PL.** Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain Cogn* 42:183-200, 2000.
- Mink JW.** The Basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Progress Neurobiol* 50:381- 425, 1996.
- Misgeld U, Calabresi P, Dodt HU.** Muscarinic modulation of calcium dependent potentials in rat neostriatal neurons. *Pflugers Arch* 407: 482-487, 1986.
- Mitchell R, Robertson DN, Holland PJ, Collins D, Lutz EM, Johnson MS.** ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by the M3 muscarinic receptor. *J Biol Chem* 278:33818-33830, 2003.
- Miyachi S, Hikosaka O, Lu X.** Differential activation of monkey striatal neurons in the early and late stages of procedural learning. *Exp Brain Res* 146:122-126, 2002.
- Morita H, Abe K, Ito Y, Inoue R.** Possible involvement of M5 muscarinic receptor in the enhancing actions of the novel gastroprokinetic agent Z-338 on nifedipine-sensitive voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in guinea pig stomach. *Jpn J Pharmacol* 89:356-365, 2002.
- Nambu A.** A new dynamic model of the cortico-basal ganglia loop. *Prog Brain Res* 143:461-466, 2004.
- Nathanson NM.** A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6245-6247, 2000.

- Nathanson NM.** Regulation of muscarinic acetylcholine receptor expression and function. *Prog Brain Res* 109:165-168, 1996.
- Newton AC.** Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:8495-28498, 1995.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC.** Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215, 2000.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ.** Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15:4449-4463, 1995.
- Olianas MC, Maullu C, Karlsson E, Onali P.** Identification of rat brain muscarinic M<sub>4</sub> receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *Eur J Pharmacol* 357:235-242, 1998.
- Olianas MC, Adem A, Karlsson E, Onali P.** Rat striatal muscarinic receptors coupled to the inhibition of adenylyl cyclase activity: potent block by the selective m4 ligand muscarinic toxin 3 (MT3). *Br J Pharmacol* 118: 283-288, 1996.
- Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ.** G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sub>2+</sub> channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25:1050-1062, 2005.
- Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Levesque M, Parent M.** Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci* 23 (10 Suppl):S20-S27, 2000.
- Park JY, Jeong SW, Perez-Reyes E, Lee JH.** Modulation of Ca(v)3.2 T-type Ca<sub>2+</sub> channels by protein kinase C. *FEBS Lett* 547:37-42, 2003.
- Pemberton KE, Hill-Eubanks LJ, Jones SV.** Modulation of low-threshold T-type calcium channels by the five muscarinic receptor subtypes in NIH 3T3 cells. *Pflugers Arch* 440:452-461, 2000.
- Pemberton KE, Jones SV.** Inhibition of the L-type calcium channel by the five muscarinic receptors (m1-m5) expressed in NIH 3T3 cells. *Pflugers Arch* 433:505-514, 1997.
- Pemberton KE, Jones SV.** Enhancement of an L-type calcium current in AtT-20 cells; a novel effect of the m4 muscarinic receptor. *Pflugers Arch* 429:699-707, 1995.
- Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E.** The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14: 1253-1256, 2003.
- Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J.** The cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca<sub>2+</sub> channels. *J Neurophysiol* 10.1152/JN.00853 Dec 22, 2004.
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J, Galarraga E.** Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281: 271-277, 1995.
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J.** Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68: 287-294, 1992.

- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P.** Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacol* 45: 45-56, 2003.
- Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM.** Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus. *J Physiol* 528 Pt 1:123-130, 2000.
- Potter LT, Flynn DD, Liang JS, McCollum MH.** Studies of muscarinic neurotransmission with antimuscarinic toxins. *Prog Brain Res* 145: 121-128, 2004.
- Prensa L, Parent A, Gimenez-Amaya JM.** Compartmentalized organization of human corpus striatum. *Rev Neurol* 28:512-519, 1999.
- Raiteri M, Marchi M, Paudice P, Pittaluga A.** Muscarinic receptors mediating inhibition of -aminobutyric acid release in rat corpus striatum and their pharmacological characterization. *J Pharm Exp Ther* 254: 496-550, 1990.
- Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, Starkova NN, Fienberg AA, Nairn AC, Surmeier DJ, Greengard P.** A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science* 306:698-701, 2004.
- Rane SG, Dunlap K.** Kinase C activator 1,2-oleoylacetyl glycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:184-188, 1986.
- Rumenapp U, Asmus M, Schablowski H, Woznicki M, Han L, Jakobs KH, Fahimi-Vahid M, Michalek C, Wieland T, Schmidt M.** The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins: regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 276:2474-2479, 2001.
- Satoh H, Nakashima T, Tsuchida K.** The responses to phorbol esters which stimulated protein kinase C in canine Purkinje fibers. *Gen Pharmacol* 23:847-852, 1992.
- Schrag A, Schelosky L, Scholz U, Poewe W.** Reduction of Parkinsonian signs in patients with Parkinson's by dopaminergic versus anticholinergic single- dose challengers. *Mov Disord* 14:252-255, 1999.
- Scroggs RS, Cardenas CG, Whittaker JA, Kitai ST.** Muscarine reduces calcium-dependent electrical activity in substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 86:2966-2972, 2001.
- Sculptoreanu A, Yoshimura N, de Groat WC, Somogyi GT.** Protein kinase C is involved in M1-muscarinic receptor-mediated facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *Neurochem Res* 26:933-942, 2001.
- Shapiro MS, Loose MD, Hamilton SE, Nathanson NM, Gomez J, Wess J, Hille B.** Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10899-10904, 1999.
- Shen JB, Pappano AJ.** On the role of phosphatase in regulation of cardiac L-type calcium current by cyclic GMP. *J Pharmacol Exp Ther* 301:501-506, 2002.
- Smith Y, Kieval JZ.** Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 23(10 Suppl):S28-S33, 2000.

- Smolders I, Bogaert L, Ebinger G, Michotte Y.** Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis. *J Neurochem* 68: 1942-1948, 1997.
- Stein A, Soong TW, Snutch TP.** Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* 15:929-940, 1995.
- Stewart AE, Yan Z, Surmeier DJ, Foehring RC.** Muscarine modulates Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat sensorimotor pyramidal cells via two distinct pathways. *J Neurophysiol* 81:72-84, 1999.
- Sugita S, Uchimura N, Jiang ZG, North RA.** Distinct muscarinic receptors inhibit release of gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2608–2611, 1991.
- Takakusaki K, Oohinata-Sugimoto J, Saitoh K, Habaguchi T.** Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Prog Brain Res* 143:231-237, 2004.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzman JN, Galarraga E, Vargas J.** Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol* 93:1119-1126, 2005.
- Tepper JM, Koos T, Wilson CJ.** GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27:662-669, 2004.
- Teramoto T, Niidome T, Kimura M, Ohgoh M, Nishizawua Y, Katayama K, et al..** A novel type of calcium channel sensitive to  $\omega$ -agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res*; 756:225-230, 1997.
- Toselli M, Lux HD.** GTP-binding proteins mediate acetylcholine inhibition of voltage dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Pflugers Arch* 413:319-321, 1989.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A.** Reflections on Ca(2+)-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18:52-54, 1995.
- Tukey JW.** Exploratory data analysis. Menlo Park, CA: Addison- Wesley, 1977.
- Ueda Y, Kimura M.** Encoding of direction and combination of movements by primate putamen neurons. *Eur J Neurosci* 18:980-994, 2003.
- Unno T, Beech DJ, Komori S, Ohashi H.** Inhibitors of spasmogen-induced Ca<sup>2+</sup> channel suppression in smooth muscle cells from small intestine. *Br J Pharmacol* 125:667-674, 1998.
- Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Vargas J.** Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* 553(Pt 1):169-182, 2003.
- Vilario MT, Mengod G, Palacios JM.** Advances and limitations of the molecular neuroanatomy of cholinergic receptors: the example of multiple muscarinic receptors. *Prog Brain Res* 98:95-101, 1993.
- Vilchis C, Vargas J, Pérez-Rosello T, Salgado H, Galarraga E.** Somatostatin modulates Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 109: 555-567, 2002.
- Vilchis C, Vargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E.** Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95: 745-752, 2000.

- Volpicelli LA, Levey AI.** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* 145:59-66, 2004.
- Weiss JL, Burgoyne RD.** Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J Biol Chem* 276:44804-44811, 2001.
- Wess J.** Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:423-50, 2004.
- Wilson CJ.** Basal ganglia. In *The Synaptic Organization of the Brain*, edn 5. Edited by Shepherd GM. Oxford: Oxford University Press; 361-414, 2004.
- Womble MD, Moises HC.** Muscarinic modulation of conductances underlying the afterhyperpolarization in neurons of the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 621:87-96, 1993.
- Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B.** Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19:726-736, 1999.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP.** Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395: 503-507, 1998.
- Xu R, Roh SG, Gong C, Hernandez M, Ueta Y, Chen C.** Orexin-B augments voltage-gated L-type Ca(2+) current via protein kinase C-mediated signalling pathway in ovine somatotropes. *Neuroendocrinology* 77:141-52, 2003.
- Yamada H, Matsumoto N, Kimura M.** Tonically active neurons in the primate caudate nucleus and putamen differentially encode instructed motivational outcomes of action. *J Neurosci* 24:3500-3510, 2004.
- Yan Z, Flores-Hernández J, Surmeier DJ.** Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103: 1017-1024, 2001.
- Yan Z, Song WJ, Surmeier J.** D2 dopamine receptors reduce N-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77:1003-1015, 1997.
- Yan Z, Surmeier DJ.** Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16: 2592-2604, 1996.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J.** Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neurosci* 22: 1709-1717, 2002.
- Zhou FM, Wilson C, Dani JA.** Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist* 9: 23-36, 2003.
- Zhu Y, Yakel JL.** Modulation of Ca<sup>2+</sup> currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 78:780-789, 1997.