

11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**"INTERACCION DE LA ACTIVACION DE RECEPTORES
COLINERGICOS Y DOPAMINERGICOS EN EL
NEOESTRIADO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

NORMA ALEJANDRA FIGUEROA RIOS

TUTORA: DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO



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 de investigación se realizó en los departamentos de neurociencias y biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Elvira Galarraga Palacio.

El presente trabajo de tesis se realizó gracias al apoyo de **DGAPA-UNAM:** IN202100, IN202300, **CONACyT** : 31839-N, **FIRCA-NIH:** TWO1214, **The Millennium Research Initiative:** W-8072 No. 35806-N.

Dedico este trabajo de tesis a mis papás: Anita y Rubén mis grandes ejemplos.

A mis hermanos: Sony y Rubenci mis cómplices en todo.

A mi sobrino: Oscar mi inspiración para seguir.

A mi esposo: Ricardo mi brazo derecho y el amor de mi vida.

Los quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Elvira Galarraga Palacio y al Dr. José Bargas Díaz su gran paciencia, su dedicación y sobre todo el haber creído en mí para realizar un estudio de doctorado.

Al Biólogo Dagoberto Tapia Ramírez por todo el trabajo de inmunohistoquímica realizado y su gran ayuda incondicional.

El presente manuscrito se revisó por el jurado integrado por los investigadores:

Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez.

Dra. María Elvira Galarraga Palacio.

Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz.

Dr. Jorge Flores Hernández.

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán.

Dr. Federico Bermúdez Rattoni.

Dr. José Bargas Díaz.

Quienes con sus comentarios y sugerencias ayudaron al buen término de este trabajo de tesis.

A mis amigos y compañeros del laboratorio durante el doctorado: Enrique Pérez, Dagoberto Tapia, Emilio Galvan, Cesar Casasola, y Eduardo Calixto, por que juntos hicimos de la ciencia una forma de vida.

A mis amigos y compañeros del instituto (IFC): Ernesto Mendoza, Fernando Peña, Tamara Pérez, Humberto Salgado, Carmen Vilchis, Jaime Napoleón, Ramiro Vergara, Fatuel Tecuapetla, Eden Flores, Salvador Hernández, Luis Carrillo, Azucena Pérez, Antonio Laville, Osvaldo Ibañes, Luis Galindo, Xochitl Ayala, Gabino Sánchez y Elizabeth Hernández.

A mis amigos y compañeros del otro lado del Atlántico (de la UMH): Mavi Sánchez Vives, Pere Berbel, Roberto Gallego, Marta Arnold, Vanessa Fernández, Gabriel Puccini, Ramon Reig, José Crespo, Alexandre Martinez, Milena Winograd, Merab Tsagareli, Albert Compte, Michael Harvey, Martín Telefont, Estela Cuevas, Francisco Castelán, Jaina Corona y Eva Ausó.

INDICE

INDICE.....	II
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.- ANTAGONISMO FUNCIONAL ENTRE LA DOPAMINA Y LA ACETILCOLINA EN EL NEOESTRIADO.....	2
2.- LA NEURONA ESPINOSA MEDIANA (NEM) DE PROYECCIÓN.....	4
3.- RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS Y MUSCARÍNICOS EN LAS NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS.....	7
4.- RESPUESTAS ELECTRICAS QUE DEPENDEN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA AL ACTIVAR LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS Y COLINÉRGICOS DE LA NEURONA ESPINOSA MEDIANA (NEM).....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
OBJETIVOS.....	23
MÉTODOS.....	24
RESULTADOS.....	27
I EFECTOS MUSCARÍNICOS SUBUMBRALES DEBIDOS A LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE LOS TIPOS M1 Y M4.....	27
II RESPUESTAS ELECTRICAS QUE DEPENDEN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA AL ACTIVAR SECUENCIALMENTE AGONISTAS MUSCARÍNICOS TIPO M1 Y DOPAMINÉRGICOS TIPO D1.	29
III EFECTOS QUE SOBRE LA FRECUENCIA DE DISPARO TIENE LA APLICACIÓN SECUENCIAL DE LOS AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS Y MUSCARÍNICOS (D1 Y M1).....	34
IV EFECTO SOBRE EL PPH Y LAS DESPOLARIZACIONES LENTAS PERSISTENTES.....	44
DISCUSION.....	49
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59

RESUMEN

El estudio de la neuromodulación del patrón temporal de disparo neuronal por transmisores es de importancia fisiológica, y tiene un amplio interés terapéutico. Resultados experimentales obtenidos sugieren un posible sustrato neuronal para el antagonismo dopamina - acetilcolina en el neostriado. A potenciales hiperpolarizados los agonistas de ambos sistemas siempre tienen un efecto opuesto sobre la excitabilidad neuronal. A potenciales despolarizados los efectos pueden ser antagónicos o sinérgicos dependiendo del orden de activación de los receptores D1 y M1, lo cual podría ser explicado por la inactivación o activación cruzadas entre las cadenas de señalización intracelular asociadas a la estimulación de los receptores D1 y M1. Este antagonismo ha podido observarse sobre la frecuencia de disparo mediante la modulación de la conductancia de calcio de tipo L. Como era de esperarse, el efecto neuromodulador de la dopamina y la acetilcolina en el neostriado es complejo y sugiere efectos diversos y sinérgicos de múltiples conductancias importantes para el adecuado funcionamiento de estas células.

El uso de toxinas muscarínicas peptidérgicas específicas confirmó que la acción producida por la muscarina sobre la frecuencia de disparo, la resistencia de entrada y la reducción del postpotencial-hiperpolarizante en las neuronas espinosas medianas, es debida a la activación de receptores muscarínicos del tipo M1 y permitió describir por primera vez que la activación de receptores muscarínicos de tipo M4 activa una conductancia catiónica inespecífica en el 40% de las neuronas espinosas.

INTRODUCCIÓN

1.- Antagonismo funcional entre la dopamina y la acetilcolina en el neostriado.

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos funcionalmente interconectados que se encuentran en el cerebro anterior y medial de los mamíferos, aves y reptiles (Wilson, 1990).

Estos son: el neostriado (NE), el globo pálido (externo e interno), la sustancia nigra (compacta y reticulata) y el núcleo subtalámico. El circuito de los GB se encuentra interpuesto entre la corteza y el tálamo y su principal tarea es la de procesar señales que fluyen de la corteza para producir una señal de salida que retorne a la corteza a través del tálamo para iniciar, controlar y modular la ejecución de los movimientos (Blandini et al., 2000).

El NE contiene los niveles más altos en el cerebro de dopamina (DA, proveniente de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta) (Bahena-Trujillo et al., 2000) y de acetilcolina (ACh, proveniente de interneuronas) (Calabresi et al., 2000). La función motora de los GB se ha inferido de las observaciones de las enfermedades entre las que resalta la enfermedad de Parkinson (EP), un desorden neurodegenerativo progresivo de los GB, caracterizado clínicamente por bradiquinesia (movimientos lentos), disquinesia (movimientos involuntarios), temblor en reposo, rigidez muscular, inestabilidad postural y declinación cognitiva, entre otros (Rao et al., 2003; Hurtig, 1997; Stern y Freese, 1997).

Estos síntomas se han asociado a una importante reducción en los niveles de DA estriatal causada por la muerte de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que inervan a las neuronas del NE (Stoof et al., 1996; Chesselet y Delfs, 1996; Zhang et al., 2000).

Se piensa que la neurotransmisión colinérgica y dopaminérgica mantienen una especie de equilibrio en el NE, con una influencia inhibitoria dopaminérgica sobre la liberación de ACh. Al perderse las terminales dopaminérgicas estriatales, se remueve este control inhibitorio tónico. El desbalance conduce a una hipereactividad de las neuronas colinérgicas (la fuente de ACh estriatal). La ACh incrementa la excitabilidad de las neuronas espinosas medianas (NEMs) del NE (Galarraga et al., 1999; Calabresi et al., 2000) lo cual incrementara la actividad del NE afectando las estructuras de salida de los GB (Pisani et al., 2003). Por tanto, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la substancia nigra compacta comanda una cascada de cambios funcionales afectando a toda la red de los GB.

Inicialmente los síntomas de la EP eran tratados con alcaloides de la belladona (agentes anticolinérgicos), de los cuales la atropina era la más común. Estos fármacos aliviaban los síntomas de rigidez y muchos de los problemas autonómicos que acompañan a la enfermedad (Brailowsky y García-Muños, 1996; Brocks, 1999), pero más tarde se vio que no todos los pacientes responden favorablemente a esta terapia.

Con el descubrimiento de la L-DOPA (en los años 60s) se comenzó la terapia sustitutiva mostrando resultados favorables para tratar los síntomas de la EP. Sin embargo con el transcurso del tiempo, al cabo de 8 a 10 años, el tratamiento pierde efectividad, presentándose disquinesias por semanas o meses (Wooten, 2001; Hely et al., 2000). Es pertinente mencionar también que estudios realizados en animales en libre movimiento muestran que la administración intraestriatal de DA atenúa la excitación producida por activación cortical en ratas (Kiyatkin y Rebec, 1996) y monos (Rolls et al., 1984).

De esta manera se llegó a la conclusión de que los síntomas de la EP podían reducirse, ya sea elevando los niveles de DA o disminuyendo los de ACh, ya que la

experiencia empírica clínica había mostrando que drogas antimuscarínicas y los precursores o agonistas dopaminérgicos eran “efectivos” en el tratamiento de los síntomas de la EP (Stoof et al., 1996; Hurting, 1997).

Barbeau en 1962, propuso que el bloqueo colinérgico imitaría, indirectamente, la inhibición dopaminérgica. Sin embargo, la DA tiene diversas acciones sobre otros elementos del estriado, y aunque la hipótesis de que los sistemas dopaminérgico y colinérgico son antagonicos y está sustentada por la experiencia clínica empírica, se desconoce cual es el sustrato neuronal de este antagonismo funcional entre la DA y la ACh en el NE.

2.- La neurona espinosa mediana (NEM) de proyección.

La NEM de proyección representa el 95 % del total de la población celular en el NE de la rata (Wilson, 1990; Bolam y Bennett, 1995). Estas neuronas reciben aferentes dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta y un suministro colinérgico proveniente de interneuronas colinérgicas (interneuronas grandes sin espinas) presentes en el NE (Kawaguchi et al., 1995; Bolam y Bennett, 1995; Bennett y Wilson, 2000; Bennet y Wilson, 1999; Bickerdike y Abercrombie, 1997). Las NEMs por lo tanto, representan un importante sustrato fisiológico y celular para la interacción DA–ACh en el NE. La población remanente del núcleo (5% de las células estriatales) consiste en interneuronas no espinosas entre las cuales se encuentran las colinérgicas, las somatostatinérgicas (también gabaérgicas) y las gabaérgicas (inmuno positivas a parvalbumina) (Kawaguchi et al., 1995; Wu y Parent, 2000).

Como características generales, las NEMs tienen un soma promedio de 15 μm de diámetro, usualmente redondo u oval en su forma que emite de 3-5 dendritas principales,

las cuales se dividen posteriormente originando las dendritas más distales (Wilson, 1998).

Esta neurona es llamada espinosa debido a la gran cantidad de espinas que cubren sus dendritas (Ver figura 1). Las NEMs contienen descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), sintetizan y liberan ácido gama amino butírico (GABA) y coexpresan algunos de estos neuropéptidos: encefalina (ENK), y/o sustancia P (SP) (Wilson, 1998, 1990; Pasik et al., 1989). Sin embargo no todos los péptidos son expresados en todas las neuronas, sino que están localizados en subconjuntos particulares de NEMs (Gerfen, 2000). De este modo, las NEMs pueden ser divididas en base a su expresión de neurotransmisores y receptores particulares, así como sus áreas de proyección, ya sea el globo pálido o la sustancia nigra reticulata (Bolam y Bennett, 1995; Gerfen, 1992; Kawaguchi et al., 1990).

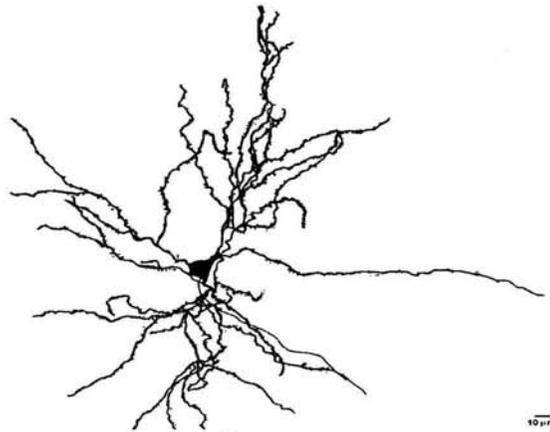


Figura 1. Neurona espinosa mediana (NEM). Reconstrucción serial de una neurona espinosa mediana del neocórtex de una ratona. La neurona fue llenada con biocitina al 1% a través del electrodo de registro y fue revelada con diaminobenzidina (D.Tapia).

La estación de entrada de los GB es el NE, el cual recibe abundantes aferentes de la corteza premotora y motora. El NE envía la información procesada a otros núcleos de salida de los GB, que han sido implicados con la ejecución y planeación motora (Graybiel

et al., 1994; Blandini et al., 2000; Desmurget et al., 2004; Shi et al., 2004). De Long (1971) fue el primero en demostrar que la actividad neuronal en los GB está correlacionada con el movimiento. La actividad neuronal de la NEM esta correlacionada con el movimiento, siendo esto una razón más para considerarlas como posible sitio de interacción entre la DA y la ACh en el NE. A partir de esto, resulta de gran interés el conocer como es el disparo de estas neuronas. Registros de la NEM realizados “in vivo” muestran que estas neuronas transitan entre dos estados de potencial de membrana (figura 2). Un estado activado (up state) y un estado inactivado (down state). En ausencia de la entrada cortical las NEMs son silentes con potenciales de membrana cercanos a los -85 mV (estando así en el estado inactivado). En respuesta a la entrada cortical las NEMs se despolarizan presentando un potencial de membrana cercano a los -55 mV (estado activado, Wilson, 1993; Wilson y Kawuaguchi, 1996).

La interacción entre los estados despolarizado e hiperpolarizado gobierna el patrón de generación de potenciales de acción en este tipo neuronal (Bennett y Wilson, 2000; Murer et al., 2003; Plenz y Kitai, 1998) ya que las espigas únicamente son generadas durante el estado activado. Estudios recientes han descrito que estos estados funcionales también pueden ser registrados “in vitro” (Vergara et al., 2003).

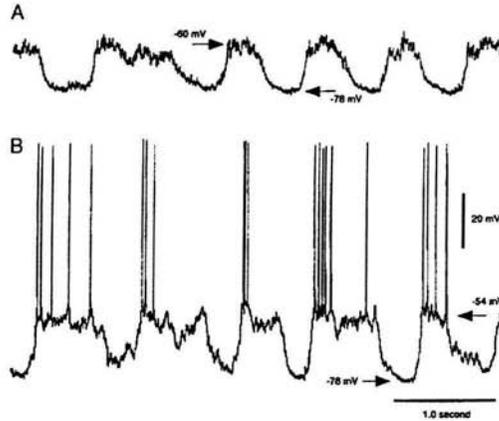


Figura 2. Transiciones del potencial de membrana. Registros intracelulares de una neurona espinosa mediana del neostriado de rata “in vivo”. A: transiciones subumbrales del potencial de membrana (flechas). B: transiciones supraumbrales del potencial de membrana, activado (-54 mV) con disparo e inactivado (-78 mV). Figura tomada de Wickens y Wilson, 1998.

3.- Receptores dopaminérgicos y muscarínicos en las neuronas espinosas medianas.

Otra razón para considerar a las NEMs como posible sitio de interacción entre la DA y la ACh en el NE es que contienen abundantes receptores tanto colinérgicos de tipo muscarínico como dopaminérgicos (Girault y Greengard, 2004; David y Harrison, 2002).

Los receptores dopaminérgicos se pueden agrupar en dos familias en base a sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: La familia D1 que comprende a los receptores: D1 y D5 (en humano) D1a y /D1b (en rata) que estimulan a la adenilato ciclasa (AC) (Flores-Hernandez, 2000) y la familia D2 que comprende a los receptores: D2 (D_{2s} y D_{2L}), D3 y D4 que inhiben las acciones de la AC (Missale et al., 1998, ver tabla 1). Ambas familias se encuentran localizadas en las NEMs (Sibley, 1995; Surmeier et al., 1996; Vallone et al., 2000; Aizman et al., 2000).

Inicialmente se planteó que la mayoría de las neuronas de proyección estriato palidales que expresan ENK contenían receptores dopaminérgicos de tipo D2 (Bernard et

al., 1992); mientras que las neuronas de proyección estriato nigrales que expresan SP, contenían receptores dopaminérgicos del tipo D1 (Gerfen et al., 1990, 1992; Surmeier et al., 1995).

RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS					
	D1	D2	D3	D4	D5
Proteína G	G α_s	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{i/o}$	G α_s
Respuesta Intracelular	Estimulan la formación de AMPc	Inhiben la formación de AMPc	Inhiben la formación de AMPc	Inhiben la formación de AMPc	Estimulan la formación de AMPc

(Missale et al., 1998). **Tabla 1.**

Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la mayoría de las NEMs coexpresan algún miembro de cada una de las familias de receptores dopaminérgicos (Missale et al., 1998; Surmeier et al., 1996; Aizman et al., 2000).

Por otro lado, los efectos de la ACh sobre las NEMs son mediados por receptores muscarínicos. Los receptores muscarínicos metabotrópicos son los receptores a ACh dominantes en el NE (Potter y Purkenson, 1995). Farmacológicamente ha sido posible dividir a los receptores muscarínicos en 2 familias: M1 (M1, M3 y M5, receptores que estimulan a la fosfolipasa C, conduciendo a la liberación de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) a través de la hidrólisis de fosfatidilinositol de la membrana) y receptores M2 (M2 y M4, receptores que inhiben a la AC resultando en una reducción de los niveles de AMPc en la célula, ver tabla 2), basados en su relativa sensibilidad al antagonista pirenzepina (Bonner, 1989; Alcantara et al., 2001; Caulfield y Bridesall, 1998).

RECEPTORES MUSCARINICOS					
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Proteína G	G $\alpha_{q/11}$	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{q/11}$	G $\alpha_{i/o}$	G $\alpha_{q/11}$
Respuesta Intracelular	Fosfolipasa C β	Inhibición Adenil ciclasa	Fosfolipasa C β	Inhibición Adenil ciclasa	Fosfolipasa C β

(Caulfield y Birdsall, 1998).Tabla 2.

En el NE, se han encontrado predominantemente tres ARNm para los receptores muscarínicos M₁, M₂ y M₄ (Weiner et al., 1990). No obstante, los receptores más ampliamente distribuidos en este núcleo son los tipos M₁ y M₄, presentes en las NEMs (Ince et al., 1997; Wang et al., 1997; Weiner et al., 1990; Levey et al., 1991; Bernard et al., 1992; Adem et al., 1997; Yan et al., 2000; Hersch et al., 1994). Los receptores del tipo M₁ se encuentran presentes en todas las NEMs, mientras que los receptores del tipo M₄ son expresados en la mitad de ellas (Yan et al., 2001). La interneurona colinérgica contiene autoreceptores muscarínicos del tipo M₂ (Zhang et al., 2002; Smiley et al., 1999) y los receptores del tipo M₃ se encuentran localizados en las terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral (Hernández-Echeagaray, 1998).

4.- Respuestas electricas que dependen del potencial de membrana al activar los receptores dopaminérgicos y colinérgicos de la neurona espinosa mediana (NEM).

Estudios previos han descrito algunos efectos electrofisiológicos en las NEMs al aplicar agonistas dopaminérgicos y colinérgicos (Hernández-López et al., 1996, 1997; Pacheco-Cano et al., 1996; Pérez-Garci, 2003; Galarraga et al., 1999; Pineda et al., 1995).

Algunos de ellos describen sus efectos sobre la frecuencia de disparo, la amplitud del postpotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un potencial de acción (PA) y los cambios en la resistencia de entrada neuronal, entre otros.

Dado que las NEMs transitan entre dos potenciales de membrana distintos es importante considerar que varias conductancias pueden ser moduladas al activar los receptores dopaminérgicos o muscarínicos de estas neuronas a diferentes potenciales de membrana (Galarraga et al., 1999b; Pacheco-Cano et al., 1996).

a) Efectos colinérgicos y dopaminérgicos sobre conductancias subumbrales de la NEM

Dado que el potencial de membrana de las NEMs oscila entre dos estados funcionales (despolarizado e hiperpolarizado) (Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996; Kitano et al., 2002), en estudios previos del laboratorio se ha utilizado un protocolo de estimulación con rampas de corriente (diseñado para mimetizar el curso temporal de disparo registrado en condiciones in vivo en estas neuronas, Galarraga et al., 1994, 1999b Ver Métodos). Al aplicar DA o agonistas dopaminérgicos del tipo D1 se observa una disminución en la frecuencia de disparo (fig. 3 A-B) debido a un aumento en el rectificador anómalo (figura 3C), lo cual aleja a la célula del umbral de disparo (Pacheco-Cano et al., 1996). La participación de esta conductancia de potasio al activar receptores del tipo D1 no ocurre al activar receptores del tipo D2 (Pacheco-Cano et al., 1996). Esta conductancia de potasio es bloqueada con cesio en el medio de perfusión y en presencia de cesio el efecto del agonista dopaminérgico se ocluye (Pacheco-Cano et al., 1996).

Utilizando este mismo protocolo la muscarina produce un aumento en la frecuencia de disparo (fig.3 D-E) que cursa con un aumento en la resistencia de entrada

neuronal (por disminución del rectificador anómalo, lo cual acerca a la neurona al umbral de disparo, Galarraga et al., 1999 a y b, ver figura 3F).

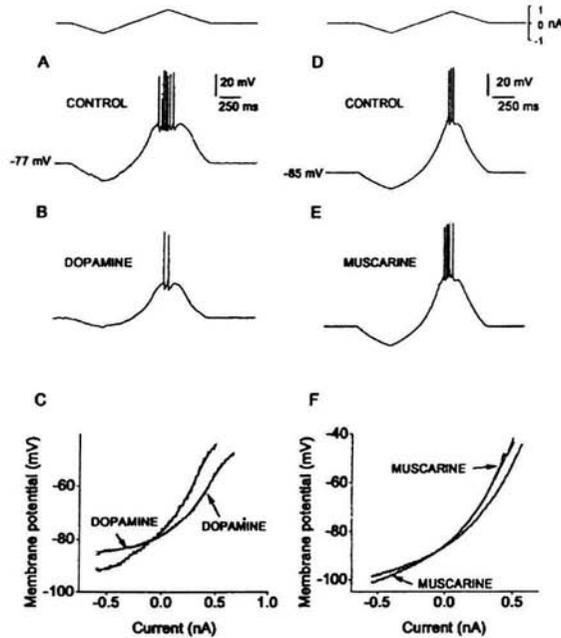


Figura 3. Cambios en las propiedades de membrana subumbral al aplicar dopamina y muscarina. **A,** El disparo se produjo con una rampa de corriente lineal (arriba), el voltaje registrado en respuesta no es lineal. **B.** La aplicación de dopamina disminuyó la frecuencia de disparo. **C,** A y B se usaron para construir la relación corriente voltaje (I/V), se observa que la dopamina disminuye la pendiente de la curva I/V (es decir disminuye la resistencia de la neurona) evitando la despolarización hacia el disparo. **D,** respuesta en condición control en otra célula. **E,** la muscarina incrementa el disparo en respuesta a la misma rampa de corriente **F,** D y E se usaron para construir la relación corriente voltaje (I/V), se observa que la muscarina incrementa la pendiente de la curva I/V (es decir aumenta la resistencia de entrada de la neurona) favoreciendo la despolarización hacia el disparo. El potencial de mantenimiento de las NEMs fue de -77 mV y -85 mV respectivamente (Galarraga et al., 1999 a).

Como se observa en la figura 3, la activación de receptores colinérgicos o dopaminérgicos en las NEMs, cuando son estimuladas eléctricamente a partir de potenciales de membrana relativamente hiperpolarizados, muestran acciones opuestas

(antagónicas) tanto a nivel subumbral (sobre el rectificador anómalo) como sobre la frecuencia de disparo (Galarraga et al., 1999b; Pacheco-Cano et al., 1996).

b) Efectos colinérgicos y dopaminérgicos sobre el patrón de disparo de la NEM.

La activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 a potenciales de membrana despolarizados (-55 mV) produce un incremento en la frecuencia de disparo de las NEMs. (Hernández-López et al., 1997). Dicho incremento sobre la frecuencia de disparo es revertido por el antagonista del canal de calcio del tipo L: la nicardipina (ver figura 4, Hernández-López et al., 1997).

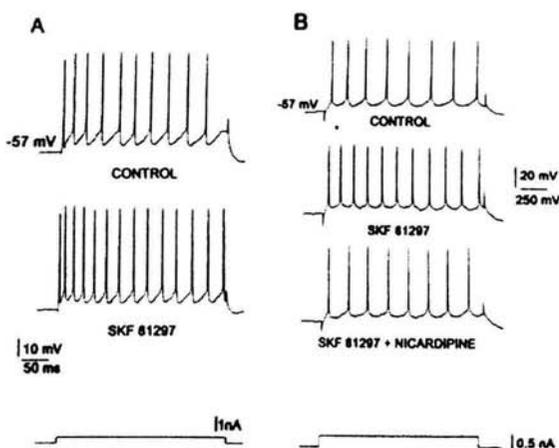


Figura 4. Aumento de la frecuencia de disparo por la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1. En A (arriba) se muestra un tren de potenciales de acción en condiciones control en respuesta a la aplicación de pulso rectangular de corriente despolarizante a un potencial de membrana despolarizado (-57 mV), abajo se muestra la misma neurona después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF81297). En B (arriba) se muestra un tren de potenciales de acción en condiciones control en otra NEM, (en medio) la misma neurona después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 y (abajo) la misma neurona después de la aplicación de nicardipina en presencia del agonista dopaminérgico (Hernández-López et al., 1997).

Tal incremento en la frecuencia de disparo por aumento de la corriente de Ca^{++} del tipo L se explica por la generación de despolarizaciones lentas persistentes, las cuales favorecen el disparo en las NEMs, ya que cuando se estimula mediante pulsos breves de corriente a potenciales de membrana despolarizados, se provocan despolarizaciones lentas persistentes, donde el agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF81297) aumenta la duración de la despolarización lenta o meseta. Así también, se ha reportado que análogos del AMPc mimetizan el efecto producido por el agonista dopaminérgico del tipo D1 incrementando también la duración de la despolarización lenta, en tanto que la calciseptina (otro bloqueador de los canales de Ca^{++} del tipo L) los bloquea (Hernández-López et al., 1997).

Por otro lado, la aplicación del agonista de canales de Ca^{++} del tipo L (BAY K 8644) también mimetiza el efecto producido por la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1. Por último, la aplicación del bloqueador de canales de Ca^{++} del tipo L, nicardipina, antagoniza el efecto producido por el agonista dopaminérgico del tipo D1 (ver figura 5).

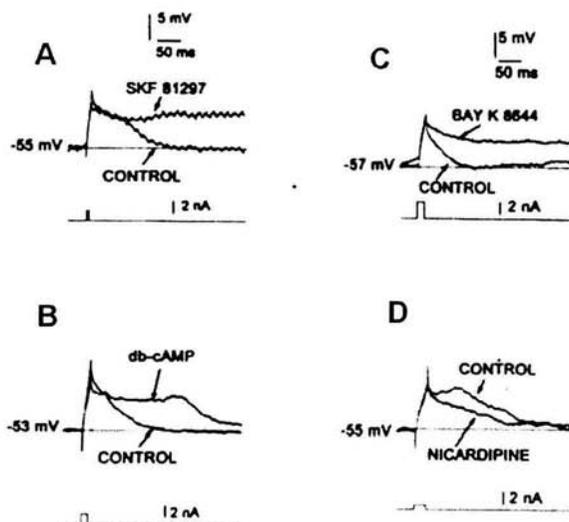


Figura 5. Generación de despolarizaciones lentas persistentes por activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1. **A**, se muestran sobrepuestas la respuesta en el voltaje producida por la aplicación de un breve pulso de corriente despolarizante en condiciones control y después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1. **B**, se observa mediante el mismo protocolo de estimulación como análogos del AMPc mimetizan el efecto producido por el agonista dopaminérgico del tipo D1. **C**, se muestra como la aplicación del agonista de los canales de calcio del tipo L, Bay K 8644 también mimetiza el efecto producido por la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 sobre la meseta y por último en **D**, se muestra como la aplicación del bloqueador de canales de calcio del tipo L (nicardipina) reduce las mesetas despolarizantes (Hernández- López et al., 1997).

Con esto se concluyó que la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 en las NEMs a potenciales de membrana despolarizados (simulando el estado activado que presentan estas neuronas en el animal completo “in vivo”) aumentan una corriente de

Ca⁺⁺ del tipo L, la cual produce mesetas despolarizantes que favorecen el disparo (Hernández-López et al., 1997).

La vía de señalización descrita al activar los receptores dopaminérgicos del tipo D1 en las NEMs, es la siguiente: El receptor dopaminérgico del tipo D1 esta acoplado a una proteína de la clase Gs, la cual es capaz de estimular a la adenilato ciclasa (AC), la estimulación de la AC eleva los niveles de AMPc citosólicos los cuales activan a la PKA para promover la disociación de las subunidades reguladora y catalítica (Snyder et al., 1998). La activación de la PKA tiene varias consecuencias, primero la fosforilación del canal de Ca⁺⁺ del tipo L y segundo, la fosforilación del inhibidor de fosfatasa endógeno DARP-32 (Svenningsson et al., 2004; Nishi et al., 1997; Greengard et al., 1998; Fienberg et al., 1998), el cual, al estar activado, va a inhibir a la fosfatasa uno C (PP1c). Esto permite al canal de calcio de tipo L estar más tiempo fosforilado, aumentando así su probabilidad de apertura (ver figura 6, Surmeier et al., 1995).

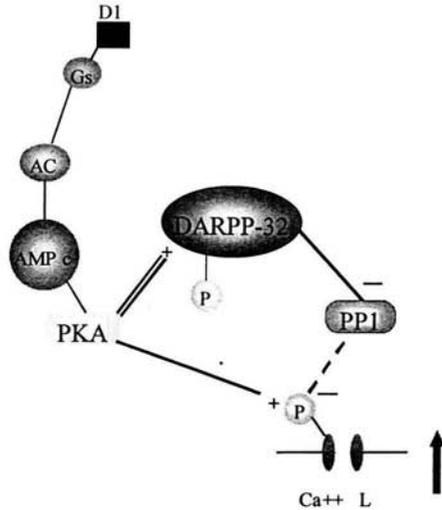


Figura 6. Esquema de la vía de señalización involucrada en la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1. El receptor dopaminérgico del tipo D1 actúa a través de una proteína de la clase Gs la cual activa a la adenilato ciclasa produciéndose una elevación de los niveles de AMPc citosólicos, dando origen a la activación de la proteína cinasa A. La activación de la PKA tiene varias consecuencias, primero la fosforilación del canal de calcio del tipo L y segundo, la fosforilación del inhibidor de fosfatasa endógena DARPP-32, el cual, al estar activado, va a inhibir a la fosfatasa uno C (PP1c), lo cual va a permitir al canal de calcio del tipo L estar más tiempo fosforilado (Surmeier et al., 1995).

En conclusión, para que el efecto sea más duradero parece ser necesario fosforilar e inhibir a la fosfatasa simultáneamente. Ahora bien, el efecto producido por la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 sobre las NEMs es dependiente del voltaje, pues los canales de Ca^{++} del tipo L son dependientes de voltaje. Como se mencionó anteriormente a potenciales de membrana despolarizados (estado activado) el efecto sobre la frecuencia de disparo es excitatorio al activarse estos canales. En contraste a potenciales hiperpolarizados (estado inactivado) su efecto es inhibitorio pues el canal facilitado es el rectificador de K^+ (ver figura 7).

De esta manera, la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 puede aumentar o disminuir la frecuencia de disparo neuronal dependiendo del potencial de membrana de la neurona .

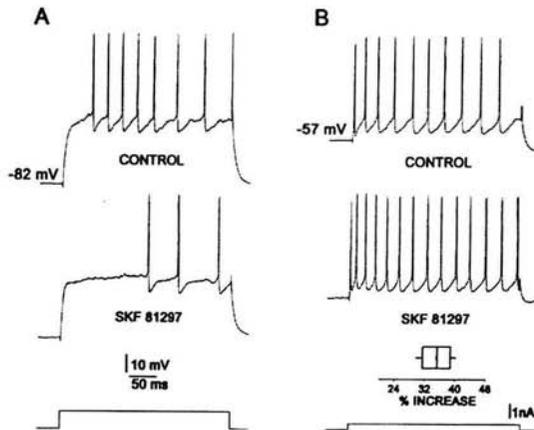


Figura 7. Efectos excitatorios o inhibitorios del agonista dopaminérgico del tipo D1, dependiendo del potencial de membrana. **A**, respuesta en el disparo a un pulso de corriente despolarizante a potencial de reposo de aproximadamente -82 mV (arriba), la misma NEM después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF81297)(abajo). Se observa una disminución en la frecuencia de disparo. En **B**, respuesta en el disparo a un pulso de corriente despolarizante a potencial de aproximadamente -57 mV (arriba), después de la aplicación del agonista (SKF81297) (abajo). Se observa un incremento en la frecuencia de disparo (Hernández-López et al., 1997).

Por otro lado, registros electrofisiológicos en las NEMs mediante la técnica de fijación de corriente, en respuesta a la aplicación de muscarina muestran un incremento en la frecuencia de disparo con respecto a los registros control. Este aumento en la frecuencia de disparo se debe a la disminución de la amplitud del PPH que sigue a cada PA, así como a la disminución del PPH al final del tren (Pineda et al., 1995). Debido a que la frecuencia de disparo neuronal se encuentra directamente determinada por la trayectoria de voltaje que sigue a los PAs (o PPH), se estudio el efecto de los agonistas colinérgicos sobre este evento, (el PPH).

El PPH depende principalmente de corrientes de K^+ activadas por Ca^{++} (Pineda et al., 1992) y el carbacol (un agonista colinérgico) es capaz de disminuir la amplitud del PPH. Por otro lado, la atropina (antagonista muscarínico) y la pirenzepina (antagonista de receptores muscarínicos de los tipos M1 y M4) bloquean el efecto del carbacol. Por tanto la reducción del PPH producido por el carbacol es a través de la estimulación de receptores muscarínicos del tipo M1 y/o M4, la galamina y el AF-DX antagonistas selectivos de los receptores M2 no bloquean los efectos producidos por el carbacol (Pineda et al., 1995).

Hasta ahora no era posible conocer el tipo de receptor muscarínico que es activado, al aplicar muscarina, (receptores M1 o M4) ya que no existían agonistas selectivos para su activación. Análogos del DAG (ej. ester de forbol dibutilil 12, 13 glicerato) mimetizan los efectos producidos por los agonistas colinérgicos, mientras que el 4 alfa-PMA, un análogo que no activa la PKC, no reprodujo el efecto del carbacol, con lo cual se concluye que la activación de receptores muscarínicos producen un incremento en la frecuencia de disparo de las NEMs debido principalmente a la reducción del PPH que sigue a cada PA (ver figura 8) y que la vía de señalización involucrada en el aumento de la frecuencia activa la vía de la fosfolipasa C (PLC) a través de la activación de proteínas Go/i (Vilchis et al., 2000).

Estudios previos han mostrado que durante el PPH participan de manera importante corrientes de potasio dependientes de la entrada de Ca^{++} de los tipos SK y BK (Pineda et al., 1995; Blatz y Magleby, 1987; Miller et al., 1985; Sah y McLachlan, 1992; Storm, 1987) y los canales de calcio del tipo N y P/Q son responsables de activar estas corrientes (Vilchis et al., 1999; Pérez-Garci et al, 2003). Adicionalmente, se sabe que la activación de receptores muscarínicos disminuye las corrientes de Ca^{++} del tipo N y P/Q (no-L, Pérez-Rosello et al., 2002; Surmeier et al., 1999), (Ver figura 9, Vilchis et al., 1999).

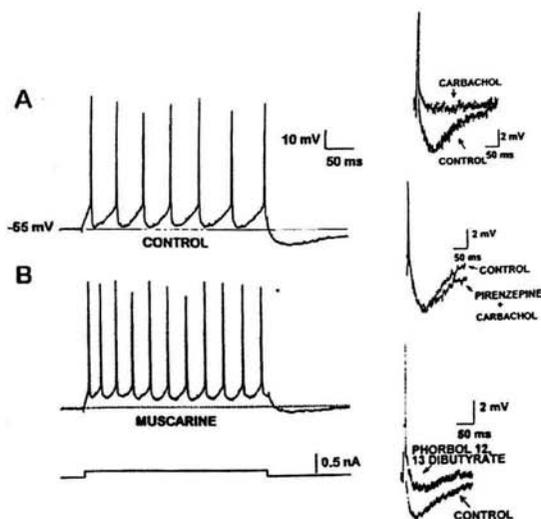


Figura 8. Aumento de la frecuencia de disparo por activación de receptores muscarínicos.

A, tren de potenciales de acción en respuesta a la aplicación de un pulso rectangular de corriente despolarizante (abajo) a un potencial de membrana despolarizado (-55 mV) en condiciones control. **B,** la misma neurona en presencia de muscarina (1 μ M), note el aumento en la frecuencia de disparo en respuesta al mismo pulso de corriente. En la columna de la derecha arriba, se muestra en otra neurona dos PPH que siguen a un PA (truncado) en condición control y después de aplicar carbacol, note la reducción en la amplitud del PPH. En medio, el efecto del carbacol sobre el PPH se bloquea en presencia de pirenzepina. Abajo, se muestra como análogos de diacilglicerol mimetizan el efecto del carbacol sobre el PPH (Pineda et al., 1995).

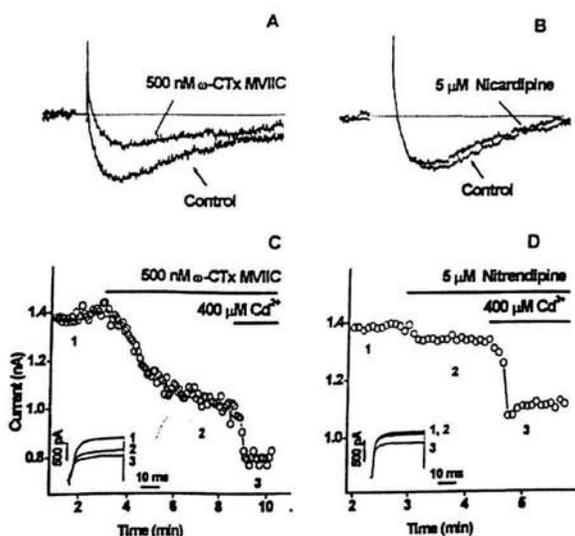


Figura 9. Participación de las corrientes de calcio del tipo “no-L”(N y P/Q) en la generación del PPH que sigue a cada PA y las corrientes de potasio dependientes de calcio en la NEM del neoestriado. En A se muestra la reducción en la amplitud del PPH que sigue a un PA (truncado) después de aplicar el bloqueador de canales de calcio del tipo no L (ω -CTx MVIIC). En B se muestra que el bloqueador de canales de calcio del tipo L (nicardipina) no tiene efecto sobre la amplitud del PPH que sigue a un PA. En C se ilustra que la ω -CTx MVIIC disminuye significativamente las corrientes de potasio dependientes de calcio y en D se muestra que la nitrendipina tiene poco efecto sobre las corrientes de potasio dependientes de calcio, note que la aplicación de cadmio reduce dichas corrientes significativamente (Vilchis et al., 2000).

La vía de señalización descrita para la activación de los receptores muscarínicos (M1) en las NEM, es la siguiente: El receptor muscarínico del tipo M1 actúa a través de una proteína de la clase Gq/11 la cual activa a la fosfolipasa C, produciéndose así la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato de la membrana celular, dando origen a los segundos mensajeros IP3 y diacilglicerol (DAG), donde el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) lo que produce la fosforilación de canales de calcio del tipo no L (N y P/Q) (ver figura 10).

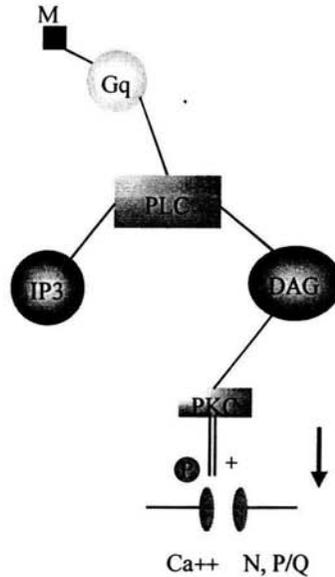


Figura 10. Esquema de la vía de señalización propuesta durante la activación de receptores muscarínicos (M1). El receptor muscarínico actúa a través de una proteína de la clase Gq/11 la cual activa a la fosfolipasa C, produciéndose la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en la membrana celular, dando origen a los segundos mensajeros IP3 y DAG, donde el DAG activa a la proteína cinasa C que produce la defosforilación de canales de calcio de los tipos N y P/Q (no L).

En resumen:

- 1.- A potenciales despolarizados el incremento de la excitabilidad producido por la muscarina, se explica por una disminución del PPH que sigue a cada PA, el cual depende de la entrada de Ca^{++} por canales de los tipos N y P/Q (figuras 8 y 9). El efecto excitatorio producido por los agonistas del tipo D1 se explica por la generación de mesetas despolarizantes resultado de un aumento en la conductancia de calcio del tipo L (figuras 4 y 5).
- 2.- A potenciales hiperpolarizados el efecto excitatorio de la muscarina se debe principalmente a una disminución de una corriente rectificadora entrante (sensible a cesio)

la cual acerca a la neurona al umbral de disparo facilitando el mismo, mientras que el efecto inhibitorio de los receptores D1 incrementa esta corriente de potasio (figura 3).

Planteamiento del problema

¿Cómo interactúan ambos efectos, el dopaminérgico (D1) y el muscarínico (M1) sobre las neuronas espinosas medianas?

Se ha descrito un aumento en la frecuencia de disparo producido por la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 y muscarínicos del tipo M1 y/o M4 a potenciales de membrana despolarizados (Hernández-López et al., 1997; Galarraga et al., 1999) lo cual sugiere un posible sinergismo sobre la frecuencia de disparo si se activan ambos receptores.

La activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 es dependiente de voltaje y a potenciales hiperpolarizados inhibe la frecuencia de disparo (Pacheco-Cano et al., 1996; Hernández-López et al., 1997), mientras que, los efectos colinérgicos sobre la frecuencia de disparo neuronal no dependen del potencial de membrana ya que tanto a potenciales despolarizados como a potenciales hiperpolarizados su efecto sobre la frecuencia de disparo siempre es excitatorio. Lo cual nos sugiere un posible antagonismo sobre la frecuencia de disparo al activar ambos receptores cuando la neurona está hiperpolarizada.

Se desconoce que tipo de receptor muscarínico está involucrado en cada uno de los efectos producidos por la activación muscarínica en estas células, ya que hasta antes de

realizarse este proyecto no se contaba con las herramientas farmacológicas capaces de activar selectivamente a los receptores del tipo M1 o del tipo M4 por separado.

Recientemente se cuenta ya con esta herramienta farmacológica: toxinas muscarínicas capaces de activar receptores del tipo M1 o M4 por separado, y que no habían sido probadas electrofisiológicamente hasta ahora (Jerusalinsky et al., 1995, Karlsson et al., 2000; Purkenson y Potter, 1998).

OBJETIVOS.

I Caracterizar los efectos electrofisiológicos subumbrales al activar receptores muscarínicos de tipo M1 o M4, e identificar la naturaleza iónica que presenta esta modulación subumbral.

II Estudiar los efectos electrofisiológicos resultado de activar secuencialmente a los agonistas dopaminérgicos del tipo D1 y muscarínicos del tipo M1.

III Estudiar los efectos que sobre la frecuencia de disparo de las NEMs, se producen al aplicar secuencialmente los agonistas dopaminérgicos de tipo D1 y muscarínicos de tipo M1 o M4, haciendo uso de las toxinas muscarínicas.

IV Encontrar evidencias de la posible participación de los canales de calcio del tipo L, o de otros tipos, en la modulación del disparo neuronal.

MÉTODOS.

Para este trabajo de tesis se realizaron registros intracelulares usando la técnica de fijación de corriente en rebanadas de cerebro de rata adulta de 350 μm de grosor (Wistar de 100 a 120 g de peso), mantenidas "in vitro", obtenidas con un vibratomo, y perfundidas con solución salina de composición (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , 10 D-glucosa, 0.0002 tiurea y 0.0002 L-acido ascórbico (saturada por carbógeno, 95% O_2 , y 5% CO_2 , a $\text{pH}=7.4$ y 300 mOsM/L y 32-34 $^\circ\text{C}$). Se utilizaron microelectrodos "finos" ("sharp") de 80-120 $\text{M}\Omega$ de resistencia d.c, llenos con una solución de 3 M de acetato de K^+ y de 1-2% de biocitina (Horikawa y Armstrong, 1988). Los registros se obtuvieron en una cámara de inmersión total con la ayuda de un amplificador d.c. de alta impedancia de entrada.

La estimulación consistió en inyecciones intracelulares de rampas de corriente (0.5-1 nA/s; 1 mV/ms, Galarraga et al., 1994; 1999a; Pacheco-Cano et al., 1996), donde el potencial de membrana cambió de -100 mV a -40 mV aproximadamente (figura 11).

Se optó por seguir este protocolo de estimulación, ya que mimetiza la trayectoria de voltaje por la cual transitan estas neuronas en el animal "in vivo" de manera espontanea (Wilson, 1998). En estas condiciones se pasa de un estado hiperpolarizado (estado de reposo) a un estado despolarizado (estado activado) del potencial de membrana. En este último estado, la NEM es capaz de generar potenciales de acción.

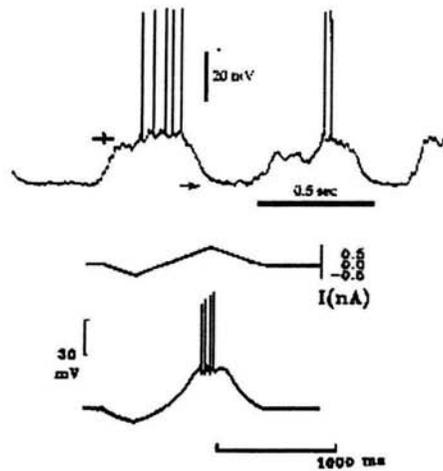


Figura 11. Comparación de la transición de voltaje registrada "in vivo" con la respuesta al inyectar una rampa de corriente "in vitro". La parte superior de la figura muestra el registro "in vivo" de la transición del voltaje que estas neuronas presentan espontáneamente. La parte inferior muestra un registro "in vitro" de la transición de voltaje en respuesta a la estimulación en una rampa de corriente.

En condiciones de fijación de corriente, la respuesta a la estimulación con rampas ayudó a probar las acciones de los fármacos en un rango subumbral de voltaje (de -100 a -45 mV). Al mismo tiempo, se evaluó la influencia de los cambios subumbrales sobre la descarga (Pacheco-Cano et al., 1996). Un cambio en la pendiente de la relación corriente voltaje (I-V) construida con la respuesta obtenida puede ser interpretada como un cambio en la resistencia de entrada (R_N) inducida por alguno de los agonistas (Galarraga et al., 1994; Pacheco-Cano et al., 1996). La resistencia de entrada, se obtuvo de la pendiente de la función I-V en su zona más lineal.

Los fármacos utilizados fueron los siguientes: N-metil D- glutamina (NMG), (para substituir al NaCl cuando se usaron concentraciones de bajo sodio), cloruro de cesio (Cs^+), cloruro de cadmio (Cd^{2+}) y tetrodotoxina (TTX), (Sigma, St.Louis, MO). Los ligandos

muscarínicos usados para cumplir los objetivos fueron: muscarina (RBI, Natick, MA), las toxinas muscarínicas MT-1 (agonista selectivo de los receptores M1) y MT-3 (antagonista específico de los receptores M4) obtenidas del veneno de la serpiente *Dendroaspis angusticeps* (Alomone Lab, Jerusalem, Israel) y la toxina MT-7, antagonista específico de los receptores M1 (Peptides Internacional, Louisville, KY). Las toxinas fueron alicuotadas y agregadas a la solución salina a concentraciones conocidas, así como el agonista dopaminérgico del receptor del tipo D1: SKF 81297 (RBI, Natick, MA).

Para estudiar la modulación del disparo repetitivo se obtuvo la relación “corriente inyectada vs frecuencia de disparo” (I-F), aplicando escalones de corriente despolarizantes de distintas intensidades, a potenciales de membrana despolarizados (de -55 a -65 mV). Las curvas I-F se realizaron en condición control y después de aplicar los agonistas muscarínicos y dopaminérgicos secuencialmente en la misma neurona. Con el fin de estudiar la modulación del potencial subumbral producida por la activación secuencial de los receptores muscarínicos y dopaminérgicos se procedió a estimular con rampas de corriente.

Por último, para estudiar el efecto de los fármacos (agonistas dopaminérgicos y colinérgicos) sobre la meseta despolarizante, que depende principalmente de una corriente calcio del tipo L y el PPH que sigue a un solo PA, que depende principalmente de corrientes de K^+ dependientes de Ca^{++} , se aplicaron breves pulsos de corriente despolarizante a potenciales de membrana despolarizados (aprox. -55 mV).

Las neuronas registradas fueron visualizadas mediante técnicas anatómicas de doble marcado con anticuerpos para SP y ENK (doble marcado, intracelular, e inmunocitoquímica contra los peptidos. Galarraga et al., 1999).

Los registros obtenidos se digitalizaron y guardaron en cintas de video que posteriormente fueron procesadas en una PC, con la ayuda del programa Lab-VIEW (National Instruments), y con los programas Sigma Plot y Origin.

RESULTADOS

I Efectos muscarínicos subumbrales debidos a la activación de receptores muscarínicos de los tipos M1 y M4.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este proyecto de tesis, mostraron con la ayuda de los péptidos selectivos para los receptores muscarínicos del tipo M1 y M4 (toxinas muscarínicas obtenidas del veneno de la serpiente *Dendroaspis angusticeps*, Jerusalinsky et al., 1995, Karlsson et al., 2000; Purkenson y Potter, 1998) que ambos receptores muscarínicos están involucrados en la modulación de la respuesta subumbral de las NEMs del NE. Los resultados fueron publicados en el siguiente artículo: "*Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons*" *Synapse* 46: 215-223 (2002) que se anexa a continuación.

Muscarinic Receptors Involved in the Subthreshold Cholinergic Actions of Neostriatal Spiny Neurons

ALEJANDRA FIGUEROA, ELVIRA GALARRAGA,* AND JOSÉ BARGAS
 Dept. de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México City, D.F. México, 04510

KEY WORDS muscarinic toxins; inward rectification; muscarinic receptors; neostriatum; M_1 -receptor; M_4 -receptor; cationic conductance

ABSTRACT Administration of the peptide MT-1 (48 nM), a selective agonist of muscarinic M_1 -type receptors, mimicked the subthreshold actions of muscarine (1 μ M) on neostriatal neurons, i.e., it produced a reduction in subthreshold inward rectification leading to an enhancement in input resistance (R_N) and evoked discharge. In all recorded cells, MT-1 effects remained in the presence of the specific peptidergic antagonist of the M_4 -type receptor, MT-3 (10 nM), but were blocked by the specific M_1 -type receptor antagonist MT-7 (5 nM). These results suggest that most muscarinic facilitatory actions in the subthreshold voltage range occur through M_1 -type receptors. However, in a fraction of cells (40%) muscarine produced an excitability enhancement not blocked by MT-7. This additional facilitatory action, not present when using MT-1, was blocked by MT-3, suggesting it was mediated by M_4 -type receptor activation. This facilitation could not be blocked by Cs^+ , TTX, or Cd^{2+} , but only by a reduction in extracellular sodium. This result is the first evidence that M_4 -type receptor activation enhances a cationic inward current in a fraction of neostriatal projection neurons. **Synapse 46:215–223, 2002.** © 2002 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

It has been demonstrated by both current- and voltage-clamp studies that muscarinic receptor agonists modulate the Cs^+ -sensitive inward rectification of neostriatal projection neurons (Dodt and Misgeld, 1986; Galarraga et al., 1999a; Hsu et al., 1996). Inward rectification dominates the subthreshold voltage behavior of spiny neurons (Galarraga et al., 1994; Nisenbaum and Wilson, 1995; Mermelstein et al., 1998; Reyes et al., 1998), and thus condition their activation properties. Voltage-clamp analysis has imputed subthreshold rectification to Kir2-type channels (Mermelstein et al., 1998). Current-clamp experiments disclosed that activation of muscarinic receptors causes a decrease in inward rectification, which in turn produces an enhancement in neuronal input resistance (R_N) and a facilitation of evoked discharge (Galarraga et al., 1999a,b; Calabresi et al., 2000). These actions can be elicited by endogenous acetylcholine (Galarraga et al., 1999a). Blockade of rectification by Cs^+ occludes most muscarinic actions (Galarraga et al., 1999a; Hsu et al., 1996). However, it has not been conclusively demonstrated which muscarinic receptors are involved in this action (Calabresi et al., 2000), since only nonselective muscarinic ligands have been tested (Galarraga et al., 1999a).

Another question is if inward rectification explains all muscarinic actions in the subthreshold range. Muscarinic receptor agonists may enhance R_N at more positive membrane potentials (i.e., between -60 mV and -45 mV) (Shen and North, 1992; Galarraga et al., 1999a,b), where inward-rectifying channels are not likely to be activated. This effect may also help to facilitate evoked discharge and it is not sensitive to Cs^+ , Cd^{2+} , TTX, or Co^{2+} (Galarraga et al., 1999a). Hence, it cannot be attributed to the inward-rectifying conductance.

Therefore, the present current-clamp analysis made use of peptides that selectively target muscarinic M_1 - and M_4 -type receptors (Bradley, 2000; Jerusalinsky et al., 1995; Karlsson et al., 2000; Liang et al., 1996;

Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant numbers: IN202100, IN202300; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 31839-N; Contract grant sponsor: FIRCA-NIH; Contract grant number: TWO1214; Contract grant sponsor: The Millennium Research Initiative; Contract grant number: W-8072 No. 35806-N.

*Correspondence to: Elvira Galarraga, Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box: 70-253, México City, D.F. México 04510. E-mail: egalarr@fisiol.unam.mx

Received 25 February 2002; Accepted 4 June 2002

DOI 10.1002/syn.10114

Purkerson and Potter, 1998) to discover: 1) the muscarinic receptors that modulate subthreshold voltage behavior in spiny neurons, 2) the percentage of cells that exhibit these subthreshold voltage behaviors, and 3) their ionic nature. A preliminary report of this study has been presented in abstract form (Figueroa et al., 1999).

MATERIALS AND METHODS

The present experiments were performed on rat dorsal neostriatal slices maintained *in vitro* as previously reported (Galarraga et al., 1999a). Briefly, Wistar rats (100–200 g) were deeply anesthetized with ether and perfused transcardially with 50 ml of an iced-cold (4°C) saline solution containing (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 10 D-glucose, 0.0002 thio-urea, and 0.0002 L-ascorbic acid (saturated with 95% O₂ and 5% CO₂; 300 mOsm/L, pH = 7.4). The brain was rapidly removed and placed into this solution before slicing. Sagittal slices (350 μm thick) of the neostriatum were obtained with a vibratome and incubated 60 min at 25°C before recording in the same saline. The slices were recorded in a submerged chamber and superfused with the same saline (except that choline-Cl or N-methyl-glucamine, NMG, substituted NaCl when using low Na⁺ saline) at 2 ml/min (34–36°C). Intracellular recordings were performed with microelectrodes filled with 3 M K-acetate (DC resistance ~80–120 MΩ). Records were obtained with an active bridge electrometer (Neuro Data; Cygnus Technology, Delaware Water Gap, PA), digitized, and saved on VHS tapes (40 kHz) to be analyzed off-line with a PC-clone computer. The preferred stimulus for the present study was a current ramp injected intracellularly (0.5–1 nA/s; 1 mV/ms) (Galarraga et al., 1994; 1999a,b; Pacheco-Cano et al., 1996). In current-clamp conditions, responses to ramp stimuli allows one to easily test the actions of a transmitter in the subthreshold voltage range (from ca. –100 to ca. –45 mV) and at the same time evaluate the influence of any subthreshold change on evoked discharge (e.g., Pacheco-Cano et al., 1996; Pineda et al., 1995). A change in the slope of the current-voltage relationship (I–V plot) built with ramp responses can be interpreted as an input resistance (R_N) change induced by the transmitter (Galarraga et al., 1994, 1999b; Pacheco-Cano et al., 1996). The I–V slope was defined quantitatively as the derivative (dV/dI) of the I–V plot at resting membrane potential (Galarraga et al., 1994). In the present study, stimulus intensity was regulated so that only a few spikes were evoked in the control condition. To take into account the variability between the samples experiments were paired, so that measurements in the presence or absence of drugs were compared in the same neuron and in the same sample with a nonparametric test (Wilcoxon's T). Although not shown for the sake of figure clarity, responses described were reversible with the exception of MT-1 toxin. Means ± SEM, medians, and ranges of R_N

changes are reported. N-methyl D-glucamine, cesium chloride (Cs⁺), cadmium chloride (Cd²⁺), and tetrodotoxin (TTX) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Muscarinic ligands were: muscarine (RBI, Natick, MA), the muscarinic toxins MT-1 and MT-3 from *Dendroaspis angusticeps* (Alomone Lab, Jerusalem, Israel) and MT-7 (Peptides International, Louisville, KY). All reagents were added from stock solutions to the bath saline.

RESULTS

A linear depolarizing current ramp typically evokes a nonlinear voltage behavior in the subthreshold range (Fig. 1A,D; stimulus ramp is on top in this and other figures). The nonlinearity of the voltage trajectory towards firing is mainly due to inward rectification (Galarraga et al., 1994; Nisenbaum and Wilson, 1995). The voltage trajectory can be used to build current–voltage relations (I–V plots) (Fig. 1C). Notice that apparent R_N (I–V plot slope) keeps increasing during constant depolarization (Fig. 1C). This inward rectification can also be observed after steady-state I–V plots built with step stimuli (not shown, but see Galarraga et al., 1994; Nisenbaum and Wilson, 1995; Reyes et al., 1998). Voltage-clamp and single-cell polymerase chain reaction (scRT-PCR) analyses demonstrated that one cause for this voltage behavior is the presence of an inward rectifying current of the Kir2 type expressed by neostriatal spiny neurons (Mermelstein et al., 1998).

The addition of muscarinic receptor agonists such as muscarine (1 μM) (Fig. 1B) produced an apparent increase in R_N in the subthreshold range (Fig. 1C, arrows) (Dodt and Misgeld, 1986; Pineda et al., 1995; Galarraga et al., 1999a,b; Calabresi et al., 2000). This is accompanied by a decrease in the inward-rectifying current (Hsu et al., 1996). In the present work, 18 neurons were analyzed quantitatively before and during muscarine administration (see Materials and Methods). Muscarine had effects in every cell tested (100%): R_N increased from (mean ± SEM) 44 ± 1.8 MΩ, median = 42 MΩ, range = 31–61 MΩ in the controls, to 58 ± 3.2 MΩ, median = 56 MΩ, range = 39–80 MΩ in the presence of 1 μM muscarine (P < 0.001; Wilcoxon's T-test). Therefore, a significant increase in R_N of about 33% (with medians) was detected after muscarine.

The peptidic muscarinic receptor agonist, MT-1 (48 nM), which is selective but not specific for muscarinic M₁-type receptors, was tested to see if it mimicked the effects of 1 μM muscarine on R_N (Fig. 1D–F). The MT-1 peptide also had effects in every cell tested: R_N was enhanced from 45 ± 12 MΩ, median = 42 MΩ, range = 17–78 in the controls to 54 ± 12 MΩ, median = 48, range = 24–88 in the presence of the MT-1 peptide (n = 6, P < 0.03, Wilcoxon's T-test). This effect was significant and about half of the effect produced by muscarine (Cf. Fig. 1C,F). However, the concentration of MT-1 employed was not saturating, since higher concentrations might affect other receptor types.

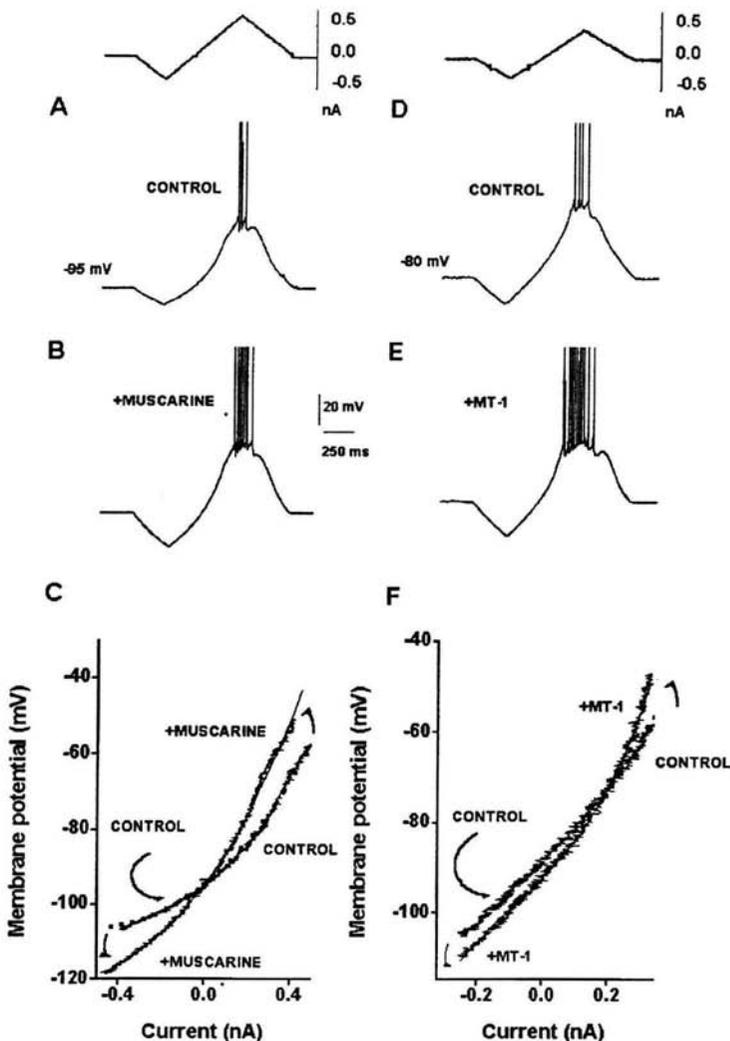


Fig. 1. Cholinergic muscarinic receptor agonists change subthreshold membrane properties of neostriatal spiny projection neurons. **A:** Firing is evoked with a linear current ramp (top). The subthreshold voltage response to the current ramp is not linear. **B:** The cholinergic muscarinic receptor agonist muscarine (1 μ M) enhances firing. **C:** When ascending voltage trajectories toward firing, in **A** and **B**, are used to build current-voltage relationships (I-V plots), it is seen that muscarine increases the slope of the I-V plot, that is, it increases input resistance (R_N), and thus favors the depolarization towards firing. **D-F:** A similar result was obtained when testing the MT-1 muscarinic peptide (48 nM).

These results suggest that, at doses that mainly bind M_1 -type receptors, the MT-1 peptide could mimic the effects of muscarine on the subthreshold voltage behavior of spiny neurons. This suggested that M_1 -type receptor activity modulates the subthreshold voltage behavior of spiny neurons. To confirm the role of M_1 -type receptors a specific antagonist, the MT-7 peptide, was tested. MT-7 (5 nM) blocked the actions of both muscarine (1 μ M) ($n = 2$) and the MT-1 peptide (48 nM) ($n = 2$). Figure 2A-C illustrates a representative experiment using MT-1.

The experiments with muscarine yielded similar results (not shown). R_N did not change during the course of the experiment (at least 1 h recording) when MT-7 accompanied MT-1. Thus, the results confirmed that M_1 -type receptor activity modulates subthreshold membrane behavior. This conclusion has been suggested previously (e.g., Galarraga et al., 1999a) using less selective antagonists (Caulfield and Birdsall, 1998), but this is the first report on the physiological actions of the muscarinic peptides on the subthreshold behavior of spiny cells.

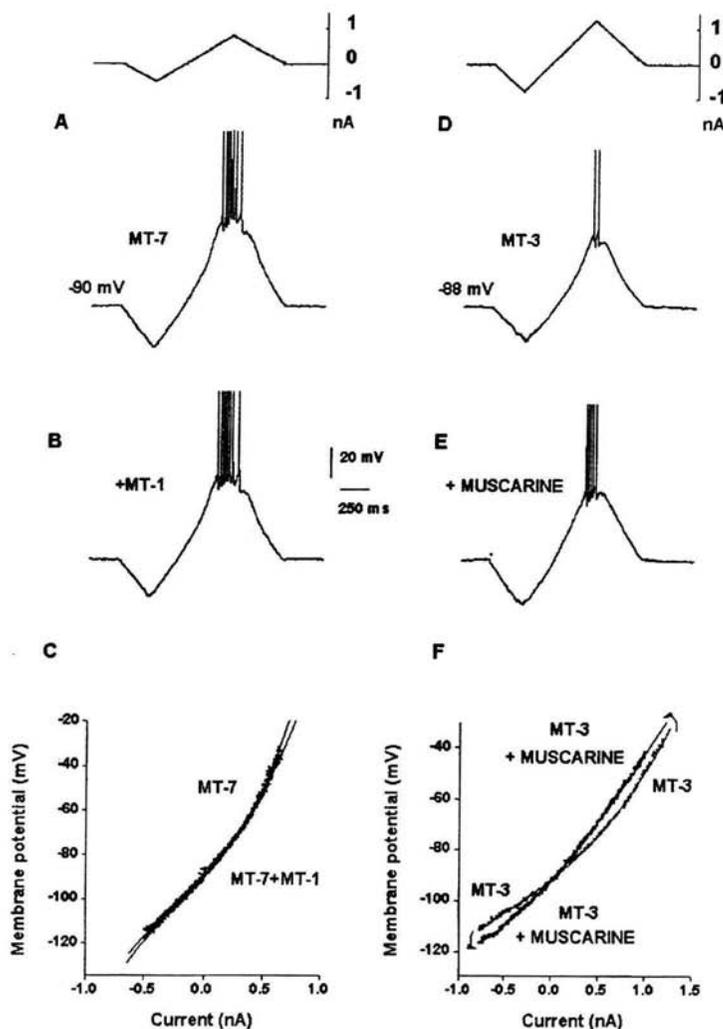


Fig. 2. Subthreshold facilitatory actions of muscarinic agonists are blocked by MT-7 but are not blocked by MT-3. **A:** Firing is evoked with a current ramp (top), as in Figure 1. The MT-7 (5 nM) peptide did not change subthreshold voltage trajectory or evoked discharge. **B:** However, MT-7 blocked the action of the agonist peptide MT-1 (48 nM), which now is unable to enhance the evoked discharge. **C:** I-V plots built from ascending records in A and B show no change when MT-1 (48 nM) was administered with MT-7 (5 nM). The same result can be obtained with muscarine (not shown). **D:** The MT-3 peptide (10 nM) did not change the subthreshold response to a current ramp. **E:** Addition of muscarine (1 μ M) had the usual effect of enhancing the evoked discharge in the presence of MT-3. **F:** I-V plots show that the MT-3 peptide could not block the usual change in slope (R_N) as a result of muscarine. The same result can be obtained with MT-1 (not shown).

To further support the above conclusion, we tested whether the specific muscarinic M_1 -type receptor antagonist, the MT-3 peptide, could block the actions of muscarine or the MT-1 peptide. Figure 2D-F illustrates a representative experiment using muscarine as the muscarinic receptor agonist. The MT-3 peptide (5–10 nM) was unable to block the R_N enhancement produced by muscarine (1 μ M) ($n = 11$). The MT-3 peptide was also unable to block the action of the MT-1 peptide ($n = 2$) (not shown). The fact that a specific M_1 -type receptor antagonist did not block most actions of muscarine, or the MT-1 peptide, whereas a specific

M_1 -type receptor antagonist easily blocked these effects allows a conclusive statement about the role of M_1 -type muscarinic receptors in the modulation of the subthreshold behavior of spiny cells. These results also show that muscarinic peptides acted as expected on neostriatal projection cells.

Nevertheless, in a sample of neurons the MT-3 peptide could block a part of the facilitatory response produced by muscarine. This additional facilitatory response was not present during MT-1 action and was only present after muscarine in a fraction of cells (7/18 or 40%). One case is illustrated in Figure 3A,B. Mus-

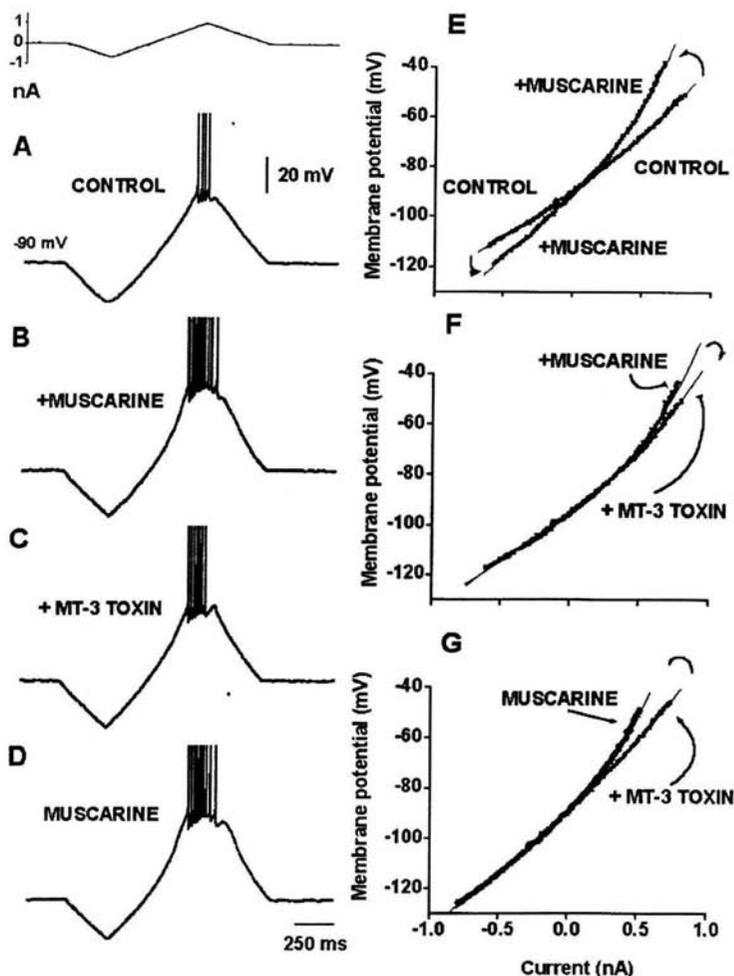
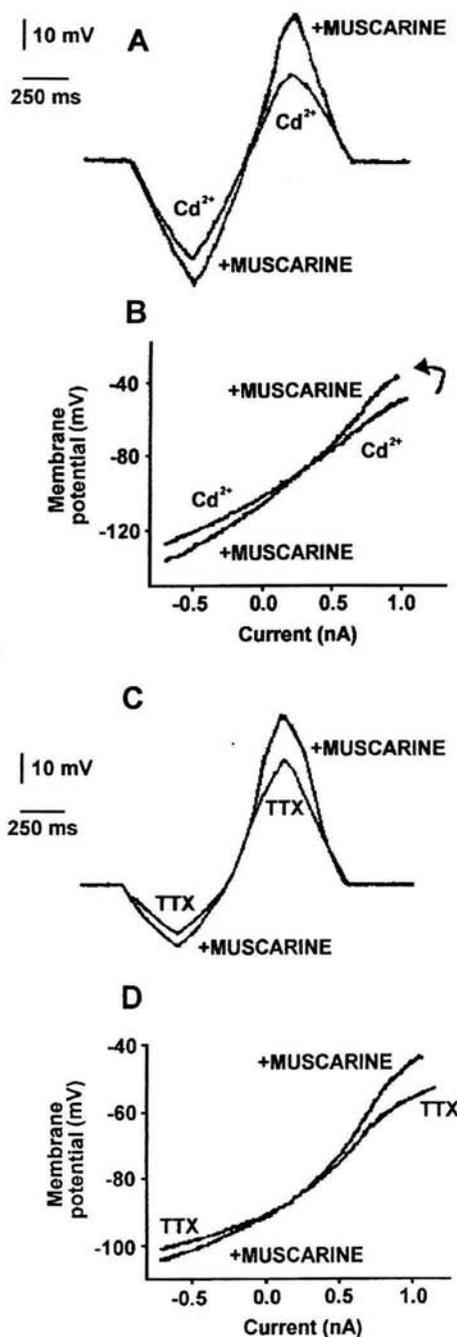


Fig. 3. The MT-3 peptide had some blocking action in some cells. **A:** Voltage response to a current ramp (top). **B:** Addition of muscarine ($1 \mu\text{M}$) produced a robust increase in the evoked discharge. **E:** Corresponding I-V plots (from ascending records in A and B) show an increase in R_N (I-V slope) after muscarine. **C:** In this cell, the MT-3 peptide had some blocking effect on the evoked discharge facilitated by muscarine. **F:** The superimposition of I-V plots taken from records B and C shows that a reduction in slope took place after MT-3. This change in slope only occurs at the most depolarized subthreshold potentials. Inward rectification in most subthreshold ranges did not change. **D:** The effect of the MT-3 peptide could be reversed after washing the toxin. **G:** Corresponding I-V plots (from ascending records C and D) show that the change in I-V slope was reversed after the toxin was washed.

carine ($1 \mu\text{M}$) produced an enhancement of R_N and evoked discharge (see corresponding I-V plots in Fig. 3E). As expected, most subthreshold actions were not reversed by MT-3, since corresponding I-V plots in Figure 3F (muscarine vs. muscarine plus MT-3) superimposed almost completely. However, Figure 3C also shows that the MT-3 peptide could reverse a part of these effects. At potentials just below firing threshold, a change in I-V slope could be detected (Fig. 3F). This was accompanied by a corresponding decrease in evoked discharge (Fig. 3C). When the MT-3 peptide was removed from the superfusion, the full I-V relation and evoked discharge obtained with muscarine alone could be recovered (Fig. 3D,G). Thus, the MT-3 peptide

did not block most effects of muscarine at subthreshold membrane potentials, especially the most negative, but partially reversed the effects of muscarine at the most positive subthreshold potentials in 40% of the neurons. This suggests the participation of an ion conductance, different from the inward rectifier, in the subthreshold response.

Figure 4 shows that the subthreshold response to cholinergic muscarinic agonists on spiny projection neurons cannot be suppressed with either sodium or calcium channel blockers. Figure 4A,C shows a superimposition of subthreshold voltage trajectories in response to current ramps (not shown) in both control conditions and in the presence of $400 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ($n = 5$)



or 1 μM tetrodotoxin (TTX) ($n = 6$). Figure 4B,D shows the corresponding I-V plots. Notice that the response to 1 μM muscarine persists in both cases. This suggests that the response to muscarine, in the entire subthreshold range, does not depend on either a Na^+ (TTX-sensitive) conductance or on a subthreshold Ca^{2+} conductance. These findings also confirm that muscarinic actions studied are direct, i.e., the receptors activated are on spiny cells (since Cd^{2+} and TTX would suppress most spontaneous, and all evoked, synaptic activity in the preparation).

Figure 5 shows the voltage responses of a cell representative of another set of experiments. In these experiments, both 5 mM Cs^+ and 1 μM TTX were administered. Thus, Figure 5A shows the block of inward rectification by Cs^+ at hyperpolarized potentials. This blockade produced a characteristic voltage trajectory that has been described with both ramp and step stimuli (Galarraga et al., 1994; Reyes et al., 1998). Notice that, under these conditions, addition of muscarine (1 μM) did not affect the hyperpolarizing region of the voltage trajectory (Fig. 5B) (see corresponding I-V plots in Fig. 5D). Thus, Cs^+ occluded most muscarinic responses at the most negative subthreshold voltage range. However, in some neurons the depolarizing region of the voltage response still exhibited an increase in slope due to muscarine (Fig. 5D). In other words, Cs^+ occluded the muscarinic action in the region where the inward-rectifying Cs^+ -sensitive conductance activates, but did not affect the muscarinic response at the more depolarized subthreshold region. In this condition we added the MT-3 peptide to the bath saline (Fig. 5C). I-V plots in Figure 5E show that this M_4 -type receptor antagonist reversed most of this muscarinic action ($n = 3$). This effect was reversible (not shown). These results confirmed that a part of the facilitatory action of muscarine in some spiny projection neurons may be mediated by M_4 -type receptors and further confirmed that they do not depend on a TTX-sensitive conductance.

Since Cs^+ , Cd^{2+} , and TTX cannot block the muscarinic response at depolarized subthreshold potentials (Figs. 4, 5) (Galarraga et al., 1999a), we performed a set of experiments in saline with a low concentration of extracellular Na^+ . The results in a representative cell

Fig. 4. Muscarinic actions take place in the absence of synaptic activity. A: In the presence of Cd^{2+} (200 μM), two subthreshold voltage responses to the same linear ramp (not depicted) were superimposed. One of the traces shows that muscarine kept changing the subthreshold voltage trajectory in the presence of Cd^{2+} . B: Corresponding I-V plots show that muscarine increased R_{in} in the presence of Cd^{2+} . Thus, responses to muscarine were neither dependent on Ca^{2+} currents nor dependent on indirect synaptic activity. C: In the presence of tetrodotoxin (TTX 1 μM), two subthreshold voltage responses to the same linear ramp (not depicted) were superimposed. One of the traces show that muscarine kept changing the subthreshold voltage trajectory in the presence of TTX. D: Corresponding I-V plots show that muscarine did not depend on Na^+ currents (TTX-sensitive) or the firing of action potentials.

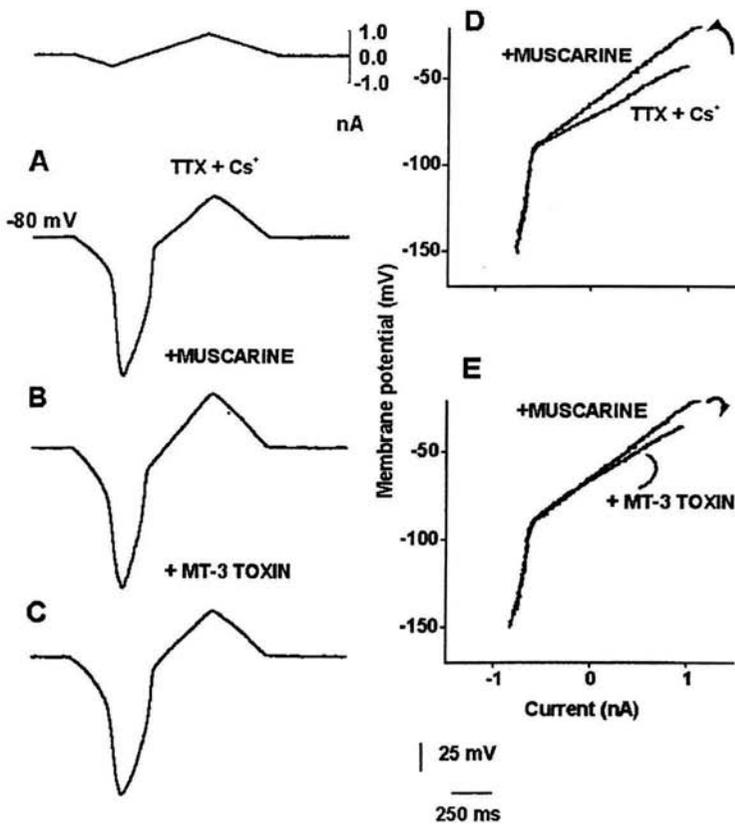


Fig. 5. Subthreshold muscarinic actions after inward rectification block. **A:** Voltage response to a current ramp (top) in the presence of Cs^+ (5 mM) and TTX (1 μM). **B:** Muscarine (1 μM) changed the voltage trajectory of the response at the most depolarized subthreshold potentials. **D:** The effect is evident when comparing the corresponding I-V plots (from ascending records in A and B). In this cell, muscarine increased I-V slope at the most depolarized voltage range. **C:** Addition of the MT-3 antagonist peptide reversed part of the muscarinic effects on the subthreshold voltage trajectory. **E:** This is evident after superimposing the corresponding I-V plots (from ascending records in B and C). Note that MT-3 greatly reversed the action of muscarine on I-V slope. It is evident that not all muscarinic effects were occluded by Cs^+ , but only those occurring at the most negative subthreshold range.

are depicted in Figure 6: in opposition to Cs^+ , a low Na^+ -saline occluded muscarinic actions at the most depolarized subthreshold potentials, but muscarinic actions at the most hyperpolarized subthreshold potentials were left intact ($n = 4$). These experiments clearly showed that a part of the muscarinic response, where the action of the M_4 -type receptor antagonist may be present, does not depend on the Cs^+ -sensitive inward-rectifying conductance.

DISCUSSION

This is the first report on the membrane actions of the muscarinic peptides (Bradley, 2000; Jerusalinsky et al., 1995; Karlsson et al., 2000; Liang et al., 1996; Purkerson and Potter, 1998) on neostriatal projection neurons. The importance of this report relies on the heavy cholinergic modulation of the neostriatal output (Calabresi et al., 2000). This work reports that muscarinic peptides acted as expected according to previous knowledge.

Nonselective antagonists (Caulfield and Birdsall, 1998) had been tested before in these neurons (Galaraga et al., 1999a; Calabresi et al., 2000). The results obtained with the peptidic antagonists supported the general view obtained with the less selective drugs and different techniques, i.e., that the main postsynaptic muscarinic receptor on spiny projection cells is the M_1 -type receptor (Alcantara et al., 2001; Consolo et al., 1987; Hersch et al., 1994; Weiner et al., 1990; Yan and Surmeier, 1996). This conclusion was reached based on the fact that a specific M_4 -type receptor antagonist (MT-3) did not block most actions of muscarine, or the MT-1 peptide, whereas a specific M_1 -type receptor antagonist (MT-7) easily blocked these effects.

The present results confirmed the important subthreshold facilitatory actions of muscarinic agonists in these neurons (Dodt and Misgeld, 1986; Galarraga et al., 1994; Nisenbaum and Wilson, 1995; Mermelstein et al., 1998; Reyes et al., 1998; Calabresi et al., 2000), namely, an increase in apparent R_{N} with a consequent

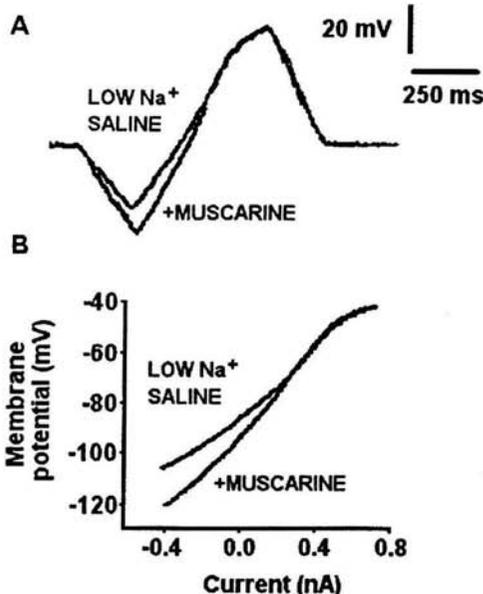


Fig. 6. Low Na^+ saline blocks muscarinic actions at the most depolarized subthreshold potentials. **A:** Two subthreshold voltage responses to a linear current ramp (not depicted), obtained in low Na^+ (25 mM) saline. Na^+ was substituted with choline. Muscarine changed the voltage trajectory of the subthreshold response only at the most hyperpolarized potentials. **B:** Corresponding I-V plots confirm that a change in I-V slope only occurred at the most hyperpolarized potentials. The muscarinic action at more depolarized subthreshold potentials was occluded.

increase in excitability and evoked discharge. Further, they show conclusively that these facilitatory actions are mainly due to M_1 -type receptor activation in the great majority of cells. The relevance of this conclusion becomes clear by recalling that endogenous acetylcholine is able to produce these actions (Galarraga et al., 1999a). And since muscarinic receptor activation also decrease outward currents activated by firing in these cells (Pineda et al., 1995; Gabel and Nisenbaum, 1999), the overall postsynaptic result due to muscarinic receptor activation is facilitation. Therefore, the main cellular correlate of the behavioral states produced by increased cholinergic activity in the neostriatum should be a facilitation of neostriatal output (Bickerdike and Abercrombie, 1997).

Other important issues arise from the present experiments: 1) Cs^+ did not occlude all the subthreshold facilitatory actions of muscarine. An additional facilitatory action may be present at less negative, but still subthreshold, membrane potentials. 2) It was confirmed that this additional facilitatory action cannot be blocked by Cs^+ , TTX, or Cd^{2+} (Galarraga et al., 1999a) but only by a low Na^+ solution. Therefore, it is not due

to the inward rectifier Kir2 channels, but is likely caused by a cationic conductance. 3) Part of this additional facilitation can be induced by activation of M_4 -type receptors in some cells (about 40% in the present sample). This last conclusion is supported by the finding that M_4 -type receptors are abundant in the neostriatum (Viláró et al., 1991) but not all projection neurons express large quantities of them (Yan et al., 2001).

In conclusion, the present results provide evidence that the subthreshold response to muscarinic receptor agonists may involve more than a single ion conductance (Shen and North, 1992; Galarraga et al., 1999a) and more than a single receptor type. Further experiments are needed to see if M_1 - and M_4 -type receptors cooperate to produce this additional facilitation. M_4 -type receptors may participate only in some cells. Perhaps both receptor types cooperate to activate the same conductance or a further dissection of ion conductances may be necessary. A difficulty of these studies is that not all cells express large quantities of both receptor types. A synergy between M_1 - and M_4 -type receptors is expected to produce a strong facilitation and enhanced excitability. It is doubtful if cells expressing M_4 -type receptors belong to the direct or the indirect pathway (Yan et al., 2001).

It is intriguing that, postsynaptically, muscarinic activation is facilitatory for the projection neurons (Galarraga et al., 1999a; Pineda et al., 1995; Gabel and Nisenbaum, 1999), whereas presynaptically it is inhibitory, i.e., it decreases the release of both glutamate from cortical afferents (Hernández-Echeagaray et al., 1998; Barral et al., 1999; Calabresi et al., 2000) and GABA from the synaptic contacts that neostriatal interneurons make on spiny neurons (Calabresi et al., 2000; Koos and Tepper, 2002). In the case of cortical afferents the receptors involved appear to be of the M_2 - and/or M_3 -types (Hernández-Echeagaray et al., 1998) and their affinity seems to be much higher than the postsynaptic receptors (nanomolar vs. micromolar range). That is, at a low level of activity the cholinergic function may be expected to repress desynchronized inputs, thus collaborating with the low level of spontaneous activity seen on the neostriatum. But a strong synchronized input will activate the cholinergic interneuron so that released acetylcholine may reach the concentration necessary to produce output facilitation (Galarraga et al., 1999a). Noticeably, a biphasic modulation has also been found for another important modulator of basal ganglia function: dopamine (Galarraga et al., 1997; Hernandez-Lopez et al., 1997, 2000). In vivo correlated experiments are needed to find out what this means. A feedback system controls the firing of the cholinergic interneuron, since inhibitory M_2 -type muscarinic autoreceptors control (Calabresi et al., 1998; Galarraga et al., 1999a; Yan and Surmeier, 1996) the firing of these interneurons and perhaps facilitates the induction of rhythmic firing patterns (Bennett and

Wilson, 1999; Dolezal and Tucek, 1999), whereas nicotinic receptors strongly activate GABAergic interneurons (Koos and Tepper, 2002). Thus, the complexity of muscarinic actions on the network is overwhelming and represents a great experimental and modeling challenge.

Antimuscarinic drugs may ameliorate the symptoms of Parkinson's disease. However, given the weak selectivity of the antagonists used in therapeutics nowadays, it is no surprise that antimuscarinics do not constitute the treatment of choice. However, a sharp division of roles in the excitability and output of the striatal net is now evident, depending on the activation of different muscarinic receptors. Therefore, the advent of a new generation of more selective antimuscarinic drugs may improve the available therapeutic choices in the near future (Eglen et al., 2001).

ACKNOWLEDGMENT

We thank D. Tapia for technical help.

REFERENCES

- Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS. 2001. 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.
- Barral J, Galarraga E, Bargas J. 1999. Muscarinic presynaptic inhibition of neostriatal glutamatergic afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Bull* 49:285-289.
- Bennett BD, Wilson CJ. 1999. Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci* 19:5586-5596.
- Bickerdike MJ, Abercrombie ED. 1997. Striatal acetylcholine release correlates with behavioral sensitization in rats withdrawn from chronic amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 818-826.
- Bradley KN. 2000. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther* 85:87-109.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sanesario G, North RA, Bernardi G. 1998. Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol Lond* 510:421-427.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. 2000. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23:120-126.
- Caulfield MP, Birdsall NJM. 1998. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290.
- Consolo S, Ladinsky H, Vinci R, Palazzi E, Wang J. 1987. An in vivo pharmacological study on muscarinic receptor subtypes regulating cholinergic neurotransmission in rat striatum. *Biochem Pharmacol* 36:3075-3077.
- Dodt HU, Misgeld U. 1986. Muscarinic excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum. *J Physiol Lond* 380:593-603.
- Dolezal V, Tucek S. 1999. Calcium channels involved in the inhibition of acetylcholine release by presynaptic muscarinic receptors in rat striatum. *Br J Pharmacol* 127:1627-1632.
- Eglen RM, Choppin A, Watson N. 2001. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 22:409-414.
- Figueroa A, Bargas J, Galarraga E. 1999. Activation of both M₁- and M₂-types of muscarinic receptor contribute to cholinergic facilitation of neostriatal spiny neurons. *Soc Neurosci Abstr* 25:1158.
- Gabel LA, Nisenbaum ES. 1999. Muscarinic receptors differentially modulate the persistent potassium current in striatal spiny projection neurons. *J Neurophysiol* 81:1418-1423.
- Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández J, Bargas J. 1994. Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100:239-249.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Barral J, Bargas J. 1997. Dopamine facilitates EPSPs through an L-type Ca²⁺-conductance. *NeuroReport* 8:2183-2186.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J. 1999a. Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different classes of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19:3629-3638.
- Galarraga E, Hernández-López S, Tapia D, Reyes A, Bargas J. 1999b. Action of substance P (neurokinin-1) receptor activation on rat neostriatal projection neurons. *Synapse* 33:26-35.
- Hernández-Echeagaray E, Galarraga E, Bargas J. 1998. 3- α -Chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37:1493-1502.
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E. 1997. D₂ receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺-conductance. *J Neurosci* 17:3334-3342.
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-García E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. 2000. D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability through a novel PLC β /IP3/calcineurin signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995.
- Hersch SM, Gutekunst C, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI. 1994. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 14:3351-3363.
- Hsu KS, Yang CH, Huang CC, Gean PW. 1996. Carbachol induces inward current in neostriatal neurons through M₁-like muscarinic receptors. *Neuroscience* 73:761-760.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Bernabeu R, Izquierdo I, Cervenansky C. 1995. Muscarinic toxins from the venom of dendroaspis snakes with agonist-like actions. *Toxicom* 33:389-397.
- Karlsson E, Jolkonen M, Mulugeta E, Onali P, Adem A. 2000. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82:793-806.
- Koos T, Tepper JM. 2002. Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22:529-535.
- Liang JS, Carsi-Gabrenas J, Krajewski JL, McCafferty JM, Purkerson SL, Santiago MP, Strauss WL, Valentine HH, Potter LT. 1996. Anti-muscarinic toxins from dendroaspis angusticeps. *Toxicom* 34:1257-1267.
- Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z, Surmeier DJ. 1998. Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* 18:6650-6661.
- Nisenbaum ES, Wilson CJ. 1995. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15:4449-4463.
- Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E. 1996. Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 110:205-211.
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J, Galarraga E. 1995. Muscarinic receptors modulate the after hyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281:271-277.
- Purkerson SL, Potter LT. 1998. Use of antimuscarinic toxins to facilitate studies of striatal m4 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284:707-713.
- Reyes A, Galarraga E, Flores-Hernández J, Tapia D, Bargas J. 1998. Passive properties of neostriatal neurons during potassium conductance blockade. *Exp Brain Res* 120:70-84.
- Shen KZ, North RA. 1992. Muscarinic increases cation conductance and decreases potassium conductance in rat locus coeruleus neurons. *J Physiol Lond* 455:471-485.
- Vilario MT, Wiederhold KH, Palacios JM, Mengod G. 1991. 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.
- Weiner D, Levey A, Brann M. 1990. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Neurobiology* 87:7050-7054.
- Yan Z, Surmeier DJ. 1996. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592-2604.
- Yan Z, Flores-Hernández J, Surmeier DJ. 2001. Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103:1017-1024.

En resumen, en cada figura del trabajo se muestran los cambios en las propiedades subumbrales de membrana al aplicar los agonistas y antagonistas muscarínicos. El disparo en todos los casos se produjo con una rampa de corriente lineal. Sin embargo la respuesta de voltaje nunca fue lineal. En todos los casos se compara a la misma neurona en condición control y después de aplicar los fármacos. Los registros en ambas condiciones se usaron para construir curvas de la relación corriente voltaje (I-V). En ellos se observan los cambios en la pendiente de la curva I-V (es decir cambios en la resistencia de entrada de la neurona), los cuales pueden evitar o facilitar la despolarización que lleva hacia el disparo.

Así, la activación de receptores muscarínicos del tipo M1 con el péptido MT-1 (agonista selectivo de estos receptores) mimetizó las acciones muscarínicas en estas neuronas tanto subumbrales como sobre la frecuencia de disparo. La rectificación anómala disminuyó y la resistencia de entrada aumentó (Fig. 1 del artículo). En todas las neuronas probadas, el efecto predominante del péptido MT-1 permaneció en presencia del péptido antagonista a los receptores del tipo M4, la toxina MT-3, pero fueron bloqueados por el antagonista específico a los receptores del tipo M1, la toxina MT-7 (Fig. 2 del artículo).

Estos resultados sugieren que la mayoría de las acciones facilitadoras de la muscarina sobre las NEMs, en los rangos subumbrales de voltaje, ocurren a través de la activación de receptores del tipo M1. Sin embargo, en un porcentaje de neuronas espinosas registradas (40 %) la muscarina produjo un incremento en la excitabilidad que no pudo ser bloqueado por el antagonista MT-7. Esta despolarización adicional nunca se presentó al aplicar MT-1 y pudo ser bloqueada por el antagonista de receptores del tipo M4 (el péptido MT-3); lo cual se muestra en la figura 3 del artículo, en donde también se observa que el bloqueo fue revertido al quitar esta toxina del medio de perfusión (figura 3D) . La

facilitación adicional atribuida a la activación de receptores del tipo M4 no pudo ser bloqueada por cadmio, TTX (figura 4) o cesio añadidos a la perfusión (figura 5).

Pero sí se bloqueó al reducir el sodio de la solución control (figura 6), lo cual sugiere que esta respuesta no es debida a canales rectificadores entrantes, sino a una posible conductancia catiónica inespecífica.

Estos resultados, sugieren por primera vez, en las NEM del NE, que la activación de receptores del tipo M4 favorecen una posible corriente catiónica en un porcentaje de estas neuronas. También confirman que el principal receptor postsináptico muscarínico en las NEMs es el receptor del tipo M1, el cual incrementa la excitabilidad de las neuronas bloqueando el rectificador entrante.

II Respuestas electricas que dependen del potencial de membrana al activar secuencialmente agonistas muscarínicos del tipo M1 y dopaminérgicos del tipo D1.

Para estudiar los efectos subumbrales producidos por la activación secuencial de receptores muscarínicos y dopaminérgicos del tipo D1 en las NEMs, se procedió a estimular mediante rampas de corriente. En la figura 12, se muestran las respuestas del potencial de membrana a la inyección de rampas de corriente (parte superior de la figura), al aplicar muscarina ($1 \mu\text{M}$) y añadir posteriormente el agonista del receptor dopaminérgico de tipo D1 ($1 \mu\text{M}$). En A se muestra la respuesta de voltaje obtenida en condición control. En B se observa que la muscarina incrementó el disparo en respuesta a la misma rampa de corriente.

Los registros mostrados en A y B se usaron para construir las relaciones I-V en D, note que la muscarina incrementó la pendiente de la curva I-V, es decir aumentó la

resistencia de entrada de la neurona en un 30%, favoreciendo la despolarización y por tanto el disparo. En promedio, la muscarina incrementó la resistencia de entrada $30 \pm 5\%$:

Este efecto se observó en todas las neuronas registradas (n=6). En C se muestra lo que sucedió cuando se administró después el agonista dopaminérgico de tipo D1 en presencia constante de muscarina. Se ve que el agonista dopaminérgico disminuyó la frecuencia de disparo en la misma neurona en 20 % revirtiendo los efectos muscarínicos

Los registros en B y C se usaron para construir las relaciones I-V de donde se observa en E que el agonista tipo D1 disminuyó la pendiente de la curva I-V, es decir, la resistencia de entrada de la neurona, evitando la despolarización hacia el disparo. En promedio el agonista tipo D1 disminuyó la resistencia de entrada un $21 \pm 4\%$ en todas las células registradas.

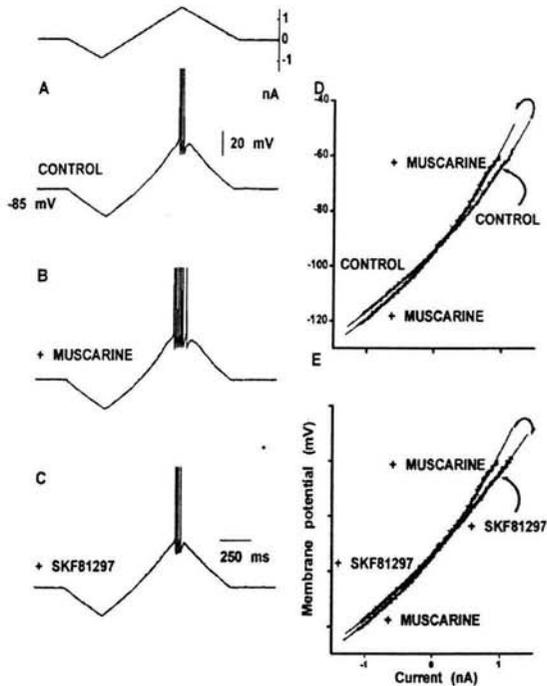


Figura 12. Cambios en las propiedades subumbrales de la membrana al aplicar secuencialmente muscarina y un agonista dopaminérgico tipo D1. **A:** El disparo se produjo con una rampa de corriente lineal pero el voltaje registrado en respuesta no es lineal. **B:** La muscarina incrementó el disparo en respuesta a la misma rampa de corriente (**D**). A y B se usaron para construir las relaciones I-V. Obsérvase que la muscarina incrementó la resistencia favoreciendo la despolarización y el disparo. **C:** La aplicación posterior del agonista dopaminérgico del tipo D1 disminuyó la frecuencia de disparo revirtiendo el efecto muscarínico. (**E**), B y C se usaron para construir las relaciones I-V. El agonista dopaminérgico tipo D1 disminuyó la resistencia de membrana de la neurona y la despolarización hacia el disparo. El potencial de mantenimiento de membrana fue de -85 mV.

En la siguiente figura 13, se muestra un experimento similar al anterior pero invirtiendo el orden de aplicación de los agonistas, es decir, primero se aplicó el agonista dopaminérgico del tipo D1 ($1 \mu\text{M}$) y posteriormente la muscarina ($1 \mu\text{M}$). En A se muestra la respuesta en el voltaje obtenida en otra neurona en condición control. En B se muestra la respuesta al mismo estímulo (rampa) obtenida después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1. Podemos observar una disminución en la frecuencia de disparo

con respecto al registro control, así como una disminución en la resistencia de entrada neuronal del 13% (ver cambio de pendientes en las curvas I/V control y en presencia de muscarina en D). En C se muestra la respuesta obtenida después de aplicar muscarina (1 μ M) en la presencia continua del agonista dopaminérgico del tipo D1 (aplicación secuencial). Se aprecia un aumento en la frecuencia de disparo neuronal y en la resistencia de entrada de 14% (ver curvas I-V en E).

Como puede observarse los efectos dopaminérgicos fueron revertidos al activar los receptores muscarínicos (n=3).

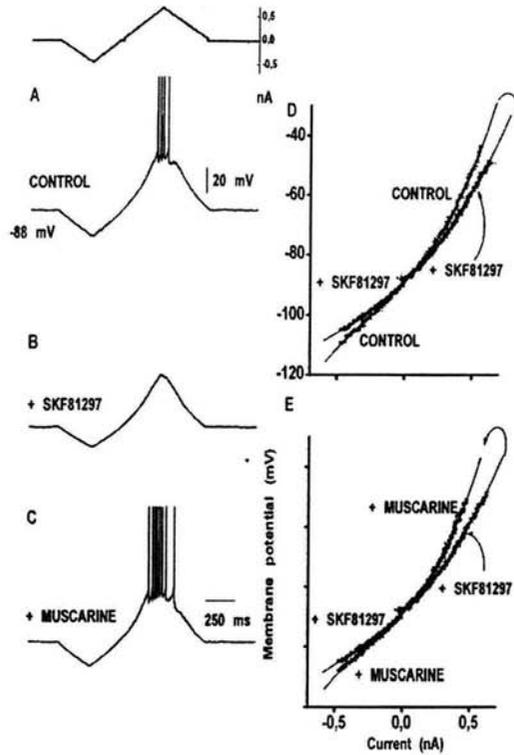


Figura 13. Cambios en las propiedades subumbrales de membrana al aplicar, secuencialmente primero el agonista dopaminérgico tipo D1 y muscarina. **A.** El disparo se produjo con una rampa de corriente de entrada (arriba) en condiciones control. **B.** El agonista del tipo D1 disminuyó el disparo en respuesta a la misma rampa de corriente. **D.** A y B se usaron para construir la relación corriente voltaje (I-V). Observe que el agonista dopaminérgico tipo D1 (SKF 81297) disminuyó la pendiente de la curva I-V (es decir redujo la resistencia de entrada de la neurona) evitando la despolarización hacia el disparo. **C.** La aplicación posterior de muscarina aumentó la frecuencia de disparo. **E.** B y C se usaron para construir la I-V. Observe que la muscarina incrementó la pendiente de la curva I-V (es decir incrementó la resistencia de la neurona) favoreciendo la despolarización hacia el disparo.

De estos experimentos se puede concluir que los efectos de los agonistas dopaminérgicos y colinérgicos sobre la resistencia de entrada neuronal y la frecuencia de disparo son opuestos, se antagonizan independientemente del orden de aplicación.

La activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 siempre produjo una disminución de la frecuencia de disparo, acompañada de una disminución en la resistencia

de entrada (efecto inhibitorio). La activación de los receptores muscarínicos (tipo M1) siempre produjo un aumento en la frecuencia de disparo neuronal, acompañado de un aumento en la resistencia de entrada (efecto excitatorio). Los resultados muestran un claro antagonismo funcional entre estos dos transmisores cuando la neurona parte desde potenciales hiperpolarizados (estado inactivo) hasta potenciales supraumbrales con disparo (estado activo).

III Efectos que sobre la frecuencia de disparo tiene la aplicación secuencial de los agonistas dopaminérgicos y muscarínicos (D1 y M1).

Primero se confirmó que la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 produce un aumento en la frecuencia de disparo cuando las NEMs son registradas a potenciales de membrana despolarizados, similares a los encontrados durante el estado despolarizado (up state): aproximadamente -55 mV.

En la figura 14 se muestra un registro electrofisiológico donde una NEM a sido despolarizada por una inyección de corriente directa intracelular hasta -55mV. La aplicación del escalón de corriente despolarizante provocó el disparo repetitivo de la NEM en condición control (Fig. 14 A.). En estas condiciones, la aplicación del agonista dopaminérgico SKF81297 (tipo D1, 1 μ M) produjo un incremento en la frecuencia de disparo para el mismo estímulo (Fig. 14 B). El agonista del receptor dopaminérgico D1 incrementó la frecuencia de disparo neuronal en un $31 \pm 6 \%$, (n=12).

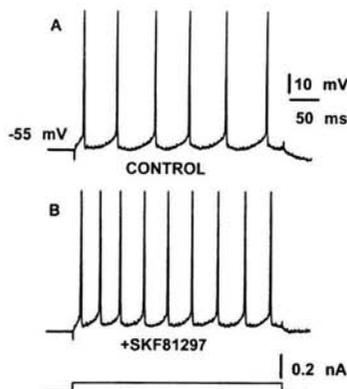


Figura 14. La activación del receptor del tipo D1 aumenta la frecuencia de disparo. **A**, disparo provocado desde un potencial despolarizado por un pulso de corriente despolarizante (mostrado abajo) y **B**, aumento en la frecuencia después de aplicar el agonista dopaminérgico del tipo D1 ($1\mu\text{M}$). La intensidad de la corriente aplicada fue de 0.07 nA .

La acción más reproducible de la muscarina es aumentar la descarga provocada por una inyección de corriente intracelular. Como se muestra en la figura 15. El aumento en la frecuencia de disparo fue de $43 \pm 6\%$, (Fig. 15 B). Este incremento en la frecuencia de disparo de las NEMs cursó con una disminución del PPH que sigue a cada PA o al tren de disparos ($n=13$).

En la figura 15, también se comparan los efectos de la muscarina con aquellos obtenidos después de la aplicación del agonista selectivo del tipo M1, la toxina MT-1 (48 nM). En D, se muestra que la toxina MT-1 mimetiza el efecto de la muscarina produciendo un incremento en la frecuencia de disparo de $36 \pm 1\%$ ($n=6$).

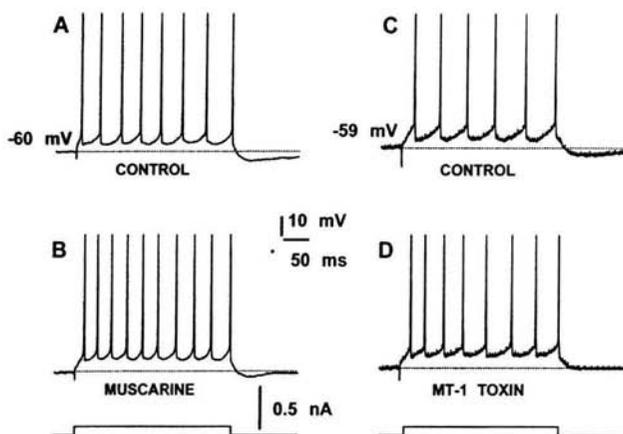


Figura 15. El aumento en la frecuencia de disparo producido por la aplicación de muscarina es mimetizado por la aplicación de la toxina muscarínica MT-1. Los registros electrofisiológicos de dos NEMs, en condiciones control (A, C) y después de la aplicación de muscarina (1 μ M , izquierda) (B) y después de la aplicación de la toxina muscarínica del tipo M1 (48 nM, derecha) (D). La intensidad de la corriente aplicada fue la misma en todos los casos.

Este efecto se debe a la estimulación de receptores muscarínicos del tipo M1, ya que la aplicación de la toxina MT-3 (10 nM, antagonista de receptores muscarínicos del tipo M4, (n=4) no fue capaz de bloquear el efecto de la muscarina (Fig. 16, E).

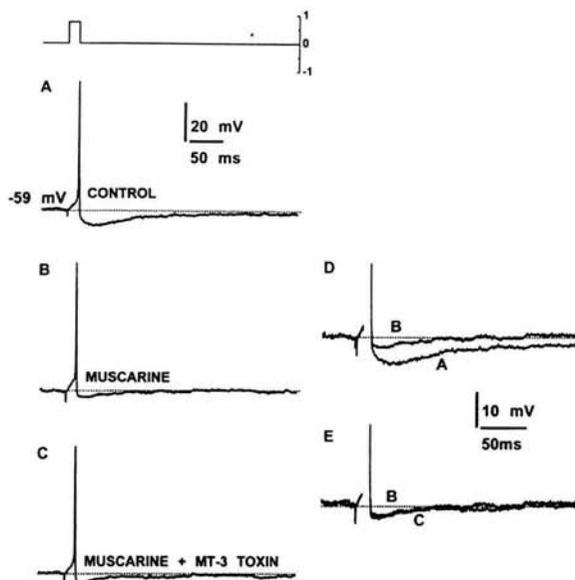


Figura 16. La reducción del PPH al añadir muscarina no se bloquea al aplicar el antagonista de receptores del tipo M4. **A.** Potencial de acción y su PPH en condición control. **B.** después de la aplicación de muscarina ($1 \mu\text{M}$) la amplitud del PPH se reduce. **C.** la aplicación de la toxina muscarínica MT-3 (10 nM) no revirtió el bloqueo muscarínico sobre el PPH. **D** (A y B sobrepuestos y amplificados) y **E** (B, C sobrepuestos y amplificados).

Conociendo que el efecto facilitatorio muscarínico observado en las NEMs se debe principalmente a la activación de receptores muscarínicos del tipo M1, se estimularon de manera secuencial receptores muscarínicos y dopaminérgicos.

Para estudiar los efectos sobre el disparo de las NEMs se realizaron curvas intensidad - frecuencia (I-F) en el estado activado (-55 mV).

En la figura 17, se muestran curvas intensidad vs frecuencia (I-F) obtenidas antes y después de aplicar de manera secuencial muscarina ($1 \mu\text{M}$) seguido del agonista del receptor dopaminérgico del tipo D1 (SKF81297, $1 \mu\text{M}$) en la misma neurona. En A se muestran tres trazos representativos de la curva I-F (D) en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades ($0.13, 0.2, 0.26 \text{ nA}$) en

condición control (frecuencia promedio 25 ± 2 Hz, $n=13$). En B se muestran los trazos representativos de la curva I-F en presencia de muscarina en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades (0.13, 0.19, 0.25 nA), donde podemos observar como la curva I-F se corre hacia la izquierda con respecto a la curva control, mostrando un aumento en la frecuencia media de disparo de 57 % (frecuencia promedio 35 ± 2 Hz, $n=13$).

En C se muestran los trazos representativos de la curva I-F en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de intensidad similares a los anteriores (0.13, 0.18, 0.23 nA), donde la aplicación adicional del agonista dopaminérgico del tipo D1 produjo un aumento adicional sobre la frecuencia de disparo de 18 %. Puede observarse como la curva I-F tiene un corrimiento adicional hacia la izquierda (frecuencia promedio 41 ± 2 Hz, $n=9$). Los cambios descritos en la figura 16, se observaron en 9 de 12 neuronas.

En tres neuronas el agonista dopaminérgico del tipo D1 redujo la frecuencia incrementada por la muscarina de 37 ± 3 % a 25 ± 3 %, $n=3$)

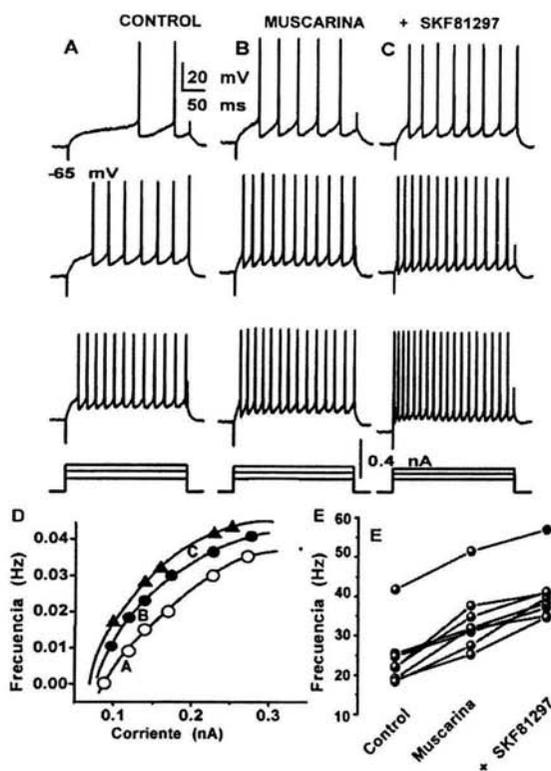


Figura 17. Efectos facilitatorios aditivos de los agonistas muscarínicos y dopaminérgicos sobre la frecuencia de disparo. Todos los registros fueron obtenidos de la misma neurona. Se muestran tres trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de pulsos de corriente de diferente intensidad, en situación control (A), en presencia de muscarina (1 μ M) (B), y finalmente con muscarina y SKF81297, agonista dopaminérgico del tipo D1 (1 μ M) (C). D, curvas I-F de la célula mostrada arriba. La muscarina aumentó la frecuencia de disparo, este efecto se refleja como un desplazamiento de la curva hacia la izquierda. El agonista dopaminérgico del tipo D1 aplicado en presencia de muscarina produjo un desplazamiento adicional en la curva I-F. La muscarina incremento en un 57 % el valor de la frecuencia media de disparo de la curva I-F. Los agonistas del tipo D1 incrementaron en 18 % adicional esta frecuencia. La acción sinérgica se observó en el 75 % de las células estudiadas (n= 9/12). E, muestra para cada célula estudiada, el aumento en la frecuencia provocada por los agonistas.

El aumento de la frecuencia de disparo producido por la aplicación de muscarina aunado al incremento adicional producido por la aplicación del agonista dopaminérgico del

tipo D1 ($1 \mu\text{M}$), fue revertido después de 45 minutos de lavado, regresando la frecuencia a los valores obtenidos en situación control.

En la figura 18, se muestra la respuesta en condiciones control a la aplicación de un pulso rectangular de corriente de intensidad supraumbral (0.13 nA), en B se muestra la respuesta de misma neurona después de la aplicación de muscarina, donde se puede observar un incremento en la frecuencia de disparo neuronal. En C se muestra la respuesta en el voltaje obtenida después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 en presencia de muscarina. Se puede observar como el agonista dopaminérgico produjo un incremento adicional sobre la frecuencia de disparo neuronal. Por último en D se muestra como los efectos son reversibles después de lavar con solución normal durante 45 min. ($n=4$).

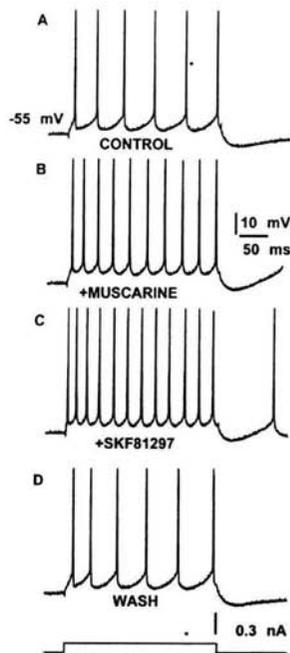


Figura 18. Las respuestas producidas por los agonistas colinérgico y dopaminérgico sobre la frecuencia de disparo son reversibles. Registros de una NEM, en condición control, después de la aplicación de muscarina ($1 \mu\text{M}$) y después de la aplicación secuencial del agonista dopaminérgico del tipo D1 ($1 \mu\text{M}$) en presencia de muscarina. Lavado de los agonistas en D (45 min).

Hicimos también experimentos invirtiendo el orden de aplicación de los agonistas (el agonista dopaminérgico del tipo D1, SKF81297, $1 \mu\text{M}$ y muscarina, $1 \mu\text{M}$). En estos casos ya no se observó un efecto aditivo si no antagónico sobre la frecuencia de disparo: En la figura 19, se muestran las curvas I-F obtenidas antes y después de la aplicación del agonista del receptor dopaminérgico del tipo D1 ($1 \mu\text{M}$), así como los efectos de la aplicación posterior de muscarina ($1 \mu\text{M}$). En A se muestran tres trazos representativos de la curva I-F en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de diferentes

intensidades (0.13, 0.23, 0.33 nA) en condición control (frecuencia promedio 22 ± 1 Hz $n=14$). En B se muestran los trazos representativos en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1 en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de intensidades similares.

Se observa como la curva I-F muestra un corrimiento hacia la izquierda (D) con respecto a la curva control. Hubo un aumento en la frecuencia de disparo de 80 % a todo lo largo de la curva (frecuencia promedio 29 ± 1 Hz $n=12$) En C de nuevo se muestran los trazos representativos de la curva I/F en respuesta a la aplicación de pulsos de corriente despolarizante de intensidades similares, después de la aplicación de muscarina. Se puede observar como la curva I-F sufre un corrimiento hacia la derecha, mostrando una disminución de la frecuencia de disparo de 77 %. Es decir la aplicación secuencial de muscarina fue capaz de revertir el efecto facilitatorio producido por el agonista dopaminérgico del tipo D1 (frecuencia promedio 23 ± 1 Hz, $n=8$). Estos efectos fueron observados en 8 de 13 neuronas). En 5 experimentos, la aplicación de muscarina en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1 tuvo efectos sinérgicos sobre la frecuencia de disparo, de 26 ± 2 Hz, a 34 ± 4 Hz, $n=5$).

Por lo tanto, los efectos combinados colinérgicos y dopaminérgicos pueden ser sinérgicos u opuestos dependiendo del orden de administración.

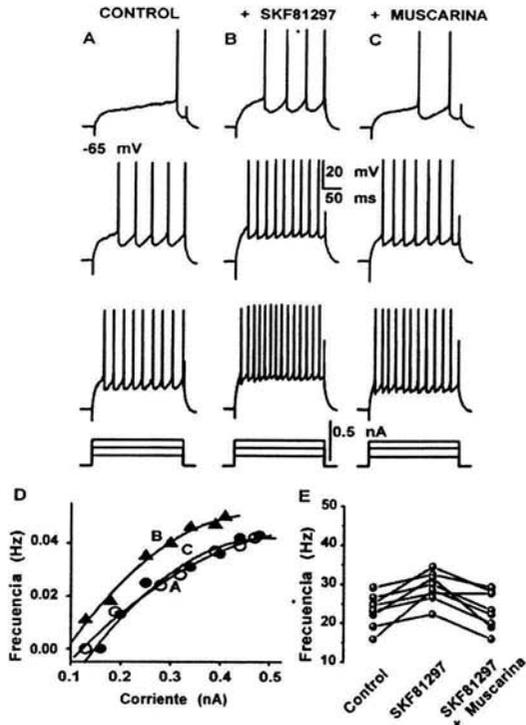


Figura 19. La activación de los receptores muscarínicos revierte el aumento en la frecuencia de disparo provocado por el agonista dopaminérgico del tipo D1. A, Registros obtenidos de una NEM. Se muestran tres trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de pulsos de corriente de diferente intensidad, en situación control (columna izquierda), en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1 (1 μ M; columna central) y después de la aplicación posterior de muscarina. (1 μ M; columna derecha). Abajo, curvas I-F de la neurona mostrada arriba. El agonista del tipo D1 aumentó la frecuencia de disparo. Este efecto se reflejó como un desplazamiento de la curva hacia la izquierda. La muscarina aplicada en presencia constante del SKF81297, revirtió el efecto excitador de los receptores del tipo D1 desplazando la curva I-F a valores similares a las de la curva control. El agonista del tipo D1 incrementó en un 80 % el valor de la frecuencia media de disparo de la curva I/F. La acción de la muscarina se observó en el 61% de las células estudiadas (n = 8/13). E, se muestra para cada célula estudiada, el aumento y posterior disminución en la frecuencia de disparo provocados por los agonistas del tipo D1 y muscarínico respectivamente.

En 35 de las neuronas registradas se realizaron experimentos de doble marcado con biocitina como marcador intracelular e inmunocitoquímica para encefalinas (n=7

inmunopositivas) o sustancia P (n=8, inmunopositivas), para conocer la naturaleza neuroquímica de las neuronas registradas.

Los resultados no mostraron que hubiese una correlación anatómica con las respuestas obtenidas al aplicar los agonistas estudiados. Es decir se observó tanto sinergismo como antagonismo en ambos tipos de neuronas espinosas medianas.

IV Efecto sobre el PPH y las despolarizaciones lentas persistentes.

Por último, se realizaron experimentos en los cuales se observara la participación de conductancias de calcio que pudieran explicar el antagonismo observado sobre la frecuencia de disparo a potenciales despolarizados. En estos se estimuló con pulsos breves de corriente para generar despolarizaciones lentas persistentes (mesetas asociadas a canales de calcio tipo L) (Hernández-López et al., 1997) y experimentos donde se generó un solo PA con su respectivo PPH (asociado a canales de calcio del tipo no-L), mostrando así la posible interacción entre los dos agonistas (a DA y a ACh) sobre la modulación de conductancias de Ca^{++} .

En la figura 20, se muestran los registros electrofisiológicos en respuesta a la estimulación con pulsos breves de corriente despolarizante (0.08 nA) a potenciales de membrana despolarizados (-55 mV). En la columna de la derecha se generaron potenciales de acción seguidos de su respectivo PPH, en condiciones control, en presencia de muscarina (1 μ M) y al aplicar, posteriormente el agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF 81297, 1 μ M). En A se muestra un PA seguido de su PPH en condición control. En B se muestra en la misma neurona, un PA seguido de su PPH después de la aplicación de muscarina, donde podemos observar como la aplicación muscarina redujo la duración y la amplitud del PPH que sigue a un PA ($55 \pm 4\%$, n=14). En C se muestra la respuesta

obtenida sobre el PPH que sigue al PA después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 en presencia de la muscarina (aplicación secuencial), donde se puede observar que no se produjo un cambio considerable en la amplitud y duración del PPH. Por último en D se sobreponen los trazos de todas las condiciones experimentales.

Por otro lado, en otra NEM se muestra el registro electrofisiológico en la columna de la izquierda, donde se generaron despolarizaciones lentas persistentes (mesetas despolarizantes), en condiciones control, en presencia de muscarina ($1 \mu\text{M}$), y después de la aplicación secuencial del agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF 81297, $1 \mu\text{M}$). En A se muestra la meseta despolarizante obtenida en condición control. En B se muestra en la misma neurona la meseta despolarizante después de la aplicación de muscarina, donde se puede observar cómo la aplicación de muscarina no tuvo efecto sobre la amplitud y duración de la meseta despolarizante. En C se muestra la respuesta obtenida después de la aplicación de muscarina en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1 (aplicación secuencial). Se observa un aumento en la amplitud y duración de la meseta despolarizante ($n=6$). Por último en D se sobreponen los trazos de todas las condiciones experimentales.

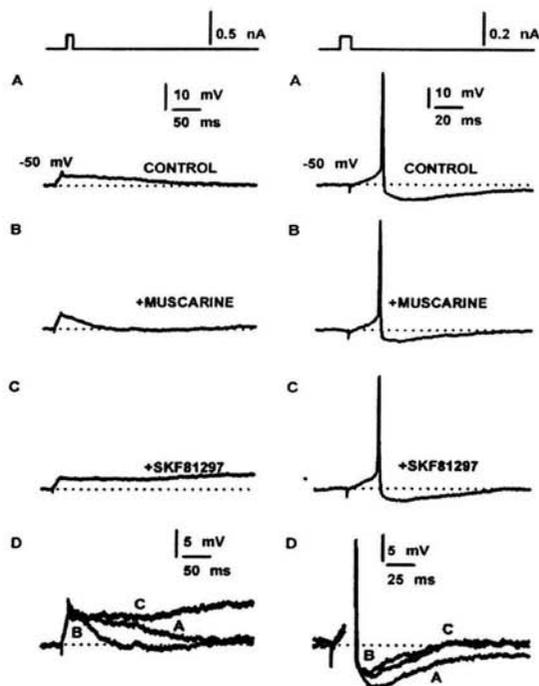


Figura 20. La aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 fue capaz de revertir la disminución en la generación de mesetas despolarizantes provocada por la acción muscarínica. **A**, la inyección de pequeños pulsos de corriente (mostrados en la parte superior) a potenciales de membrana subumbrales (-55 mV), provocaron despolarizaciones sostenidas que sobrepasan la duración del estímulo (mesetas). **B**, la muscarina (1 μ M) disminuyó la probabilidad de aparición de estas mesetas. **C**, el agonista SKF81297 (1 μ M) añadido en presencia de la muscarina fue capaz de revertir la acción muscarínica sobre la meseta. **D** registros anteriores sobrepuestos. En la columna de la derecha, la estimulación con pulsos breves de corriente despolarizante a potenciales de membrana despolarizados generaron PAs únicos seguidos de su PPH, en condiciones control (**A**). En presencia de muscarina (1 μ M) (**B**) y después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1 (1 μ M) en **C**. En **D** están los registros de los PPHs sobrepuestos, note que el agonista dopaminérgico del tipo D1 no revierte la disminución del PPH producida por la muscarina.

De experimentos similares a los anteriores invirtiendo el orden de aplicación de los agonistas y siguiendo los mismos protocolos de estimulación se obtuvieron los siguientes resultados:

En la figura 21, se muestran registros electrofisiológicos en respuesta a la estimulación con pulsos breves de corriente despolarizante a potenciales de membrana

despolarizados (-55 mV). En la columna de la izquierda se generaron despolarizaciones lentas persistentes (mesetas despolarizantes). En A, se muestra la meseta despolarizante obtenida en condición control. En B, se muestra la meseta despolarizante después de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1, donde podemos observar como la aplicación del agonista dopaminérgico aumentó la duración de la meseta despolarizante. En C se muestra la respuesta obtenida después de la aplicación de muscarina en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1. Obsérvese que disminuye la amplitud y duración de la meseta despolarizante (n=6). En D se sobreponen los trazos de todas las condiciones experimentales. Esto es, si se aplica después del agonista dopaminérgico del tipo D1, la muscarina revierte los efectos dopaminérgicos.

En la columna de la derecha, se muestra el registro electrofisiológico en otra neurona. Se generaron potenciales de acción en respuesta a la estimulación con pulsos breves de corriente despolarizante a potenciales de membrana despolarizados (-55 mV).

Los PAs son seguidos por su respectivo PPH. A, en condición control, B, en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF 81297, 1 μ M) donde podemos observar que se produce un ligero aumento en la duración y la amplitud del PPH que sigue a un PA. Después se aplicó muscarina (1 μ M). Se puede observar que la aplicación de muscarina redujo la amplitud y duración del PPH (n=6). Por último en D se sobreponen los trazos de todas las condiciones experimentales. De nuevo se observó que la muscarina revirtió los efectos dopaminérgicos.

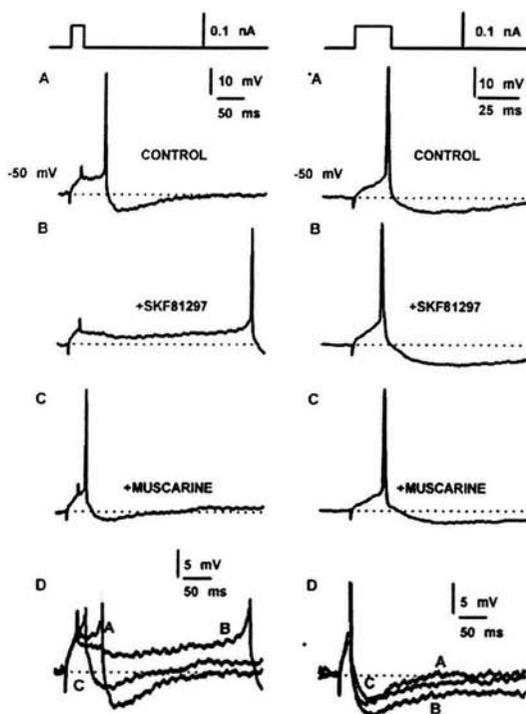


Figura 21. La activación de los receptores muscarínicos abolió la generación de las mesetas despolarizantes facilitadas por los receptores dopaminérgicos del tipo D1. A, la inyección de pequeños pulsos de corriente (mostrados en la parte superior) a potenciales despolarizados provocaron despolarizaciones sostenidas capaces de generar disparo mucho después de que terminó el estímulo. B, el agonista del tipo D1, SKF81297, aumentó la probabilidad de aparición y prolongó la duración de las mesetas. C, la muscarina añadida después del agonista del tipo D1, revirtió el efecto despolarizante. D, sobreposición y amplificación de los registros anteriores. En la parte derecha de la figura, pulsos breves de corriente despolarizante a potenciales de membrana despolarizados generaron PAs seguidos de su PPH en condiciones control (A), en presencia del agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF 81297, $1\mu\text{M}$) (B) y después de la aplicación de muscarina ($1\mu\text{M}$) (C). En D, PPHs sobrepuestos, la muscarina reduce el aumento en la amplitud del PPH producido por el agonista dopaminérgico del tipo D1.

DISCUSION

La experiencia clínica ha mostrado que los antagonistas colinérgicos y los agonistas dopaminérgicos ayudan a aliviar los síntomas de la Enfermedad de Parkinson, lo cual sugiere un claro antagonismo funcional entre estos dos neurotransmisores. Así también se ha mostrado que la actividad neuronal en los GB esta correlacionada con el movimiento y que las neuronas espinosas medianas (principal tipo neuronal del NE) es el blanco principal para que se lleve a cabo este antagonismo.

I Efectos electrofisiológicos muscarínicos que dependen del potencial de membrana al activar receptores muscarínicos de los tipos M1 o M4.

En este trabajo de tesis se muestra por primera vez los efectos de los péptidos muscarínicos (toxinas muscarínicas) (Jerusalinsky et al., 1995, Karlsson et al., 2000; Purkenson y Potter, 1998; Potter et al., 2004; Bradley, 2000; Jerusalinsky et al., 2000; Liang et al., 1996; Nasman et al., 2000; Potter, 2001), sobre las respuestas electrofisiológicas de las NEMs.

Los resultados obtenidos con las toxinas muscarínicas son de importancia fisiológica, ya que al aplicar la muscarina ésta se une de manera no selectiva a los receptores presentes en las NEMs, ya sean receptores del tipo M1 o M4 (Pineda et al., 1995; Yan y Surmeier, 1996). Estas toxinas son la única herramienta farmacológica actual para poder activar los receptores muscarínicos del tipo M1 o M4 por separado (Harvey et al., 2002; Carsi y Potter, 2000; Vandermeers et al., 1995; Potter et al., 1998; Adem et al., 1997; Max et al., 1993). El uso de estas toxinas permitió mostrar que el principal receptor muscarínico postsináptico de las NEMs es el receptor del tipo M1 (Hersch et al., 1994; Weiner et al., 1990; Yan y Surmeier, 1996) ya que la toxina MT-1 (agonista selectivo de

receptores del tipo M1) mimetizó los efectos muscarínicos observados en todas las neuronas registradas y el antagonista peptidérgico del receptor muscarínico del tipo M4 (toxina MT-3) no fue capaz de bloquear sus efectos.

Los resultados obtenidos confirmaron las acciones facilitatorias subumbrales de los agonistas muscarínicos (Dodt y Misgeld, 1986; Galarraga et al., 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995; Mermelstein et al., 1998; Reyes et al., 1998; Calabresi et al., 2000), sobre la resistencia de entrada y el disparo neuronal, debidos principalmente a la activación del receptor muscarínico del tipo M1. Se ha demostrado que la acetilcolina endógena, es capaz de producir los mismos efectos (Galarraga et al., 1999a). A potenciales hiperpolarizados el efecto muscarínico, a través de receptores del tipo M1, está asociado al bloqueo de una corriente de potasio sensible a cesio, el rectificador anómalo (Galarraga et al, 1994, 1999, Reyes et al, 1998).

Los experimentos obtenidos en esta tesis (publicados en la revista Synapse) muestran por primera vez, que en el 40% de las neuronas espinosas es posible activar receptores muscarínicos del tipo M4. El cesio no es capaz de ocluir este efecto, por lo que no se debe a la acción sobre el rectificador anómalo (como en el caso de los receptores M1). La acción excitatoria asociada a los receptores del tipo M4 es subumbral y no se bloqueó en presencia de TTX o Cd^{2+} lo cual permite afirmar que se trata de un efecto directo postsináptico sobre la neurona registrada (Galarraga et al., 1999 a). Pero sí se bloqueó al reducir el sodio de la solución. Lo anterior, permite concluir que la respuesta observada al activar los receptores del tipo M4 está asociada a una corriente catiónica inespecífica, efecto muscarínico descrito en otros tipos neuronales (Guerineau et al., 1995; Distasi et al., 2002; Shen y North, 1992). Los resultados electrofisiológicos mostraron una correlación importante con estudios realizados con

técnicas de PCR en éstas neuronas, en los cuales se ha descrito que sólo en la mitad de las NEMs están presentes los receptores del tipo M4 (Vilaró et al., 1991; Yan et al., 2001).

Se concluye que la acetilcolina puede modular varias conductancias subumbrales dependiendo del potencial de membrana de la NEM, a través de la activación de receptores del tipo M1 o M4, siendo ambos efectos facilitatorios.

II Efectos electrofisiológicos que dependen del potencial de membrana al activar secuencialmente agonistas dopaminérgicos del tipo D1 y muscarínicos del tipo M1.

El protocolo de estimulación con rampas de corriente, que reproduce la transición entre estados funcionales que exhiben las NEMs “in vivo” (silente y activado), nos permitió observar los efectos electrofisiológicos subumbrales causados por la activación secuencial de los receptores muscarínicos y dopaminérgicos (Galarraga et al., 1994, 1999a,b; Pacheco-Cano et al., 1996). Los resultados mostraron claramente que sin importar el orden de aplicación de los agonistas siempre se obtiene una respuesta antagónica sobre el disparo neuronal y la resistencia de entrada. Es decir, cuando se aplica el agonista dopaminérgico del tipo D1 siempre se obtiene una disminución de la frecuencia de disparo y la resistencia de entrada neuronal. Cuando se aplica la muscarina (y se activan los receptores muscarínicos de tipo M1) siempre se produce un aumento en la frecuencia de disparo y un aumento en la resistencia de entrada neuronal. La activación de receptores del tipo M4 (presentes en la mitad de las NEMs) sólo reforzaría el efecto excitatorio producido por los receptores del tipo M1.

De esta manera hemos dado fundamentos fisiológicos a nivel celular del antagonismo funcional entre estos dos neurotransmisores: ACh y DA, sobre la NEM.

Estos resultados resultan de importancia funcional considerando que los receptores

muscarínicos y dopaminérgicos pueden ser activados cuando la neurona se encuentra en el estado inactivado (down state) o durante la trayectoria del voltaje hacia el estado activado (up state). En este caso, tenemos un claro antagonismo funcional, independientemente del orden en que se activen o interactúen estos receptores. Si se activan primero los receptores dopaminérgicos del tipo D1, la neurona tiende a permanecer silente o en el estado hiperpolarizado. Cabe recordar que los receptores dopaminérgicos del tipo D2 no tienen efecto sobre el rectificador anómalo (Pacheco-Cano, 1996, Pérez-Garci, 2000). Por el contrario, si primero se activaran los receptores del tipo M1, la transición hacia el estado activado se vería favorecida. En aquellas neuronas que presentan receptores del tipo M4 (40 % de la NEMs) el disparo sería mucho más robusto y también opuesto al efecto dopaminérgico.

III Efectos sobre la frecuencia de disparo de las NEMs al aplicar secuencialmente los agonistas dopaminérgicos del tipo D1 y muscarínicos del tipo M1.

Tanto el estado activado como el inactivado de las NEMs (Wilson y Kawaguchi, 1996; Stern et al., 1997; Wilson, 1993) son importantes para el buen funcionamiento del NE. Sin embargo, solo durante el estado activado se facilita el disparo neuronal, el cual ha sido asociado con las funciones motoras (Rebec, 2000; West et al., 1997; Trytek et al., 1996; Gardiner y Nelson, 1992). Por lo tanto, el impacto que la activación secuencial de los agonistas colinérgicos y dopaminérgicos tienen sobre el disparo neuronal es muy importante.

Los resultados de esta tesis mostraron que el disparo de las NEMs (a potenciales de membrana de -55 mV) es modulado por la ACh a través de la activación de receptores muscarínicos (del tipo M1), ya que la aplicación de la toxina muscarínica MT-1 (agonista

selectivo de receptores del tipo M1) fue capaz de mimetizar los efectos producidos por la aplicación de muscarina (incremento en la frecuencia de disparo). Mientras que la aplicación de la toxina MT-3 (antagonista de los receptores muscarínicos del tipo M4) no revirtió este efecto sobre la frecuencia.

La aplicación de muscarina, seguida de la aplicación del agonista dopaminérgico del tipo D1, tuvo efectos sinérgicos sobre la frecuencia de disparo neuronal. Resultado que se esperaba, ya que ambos agonistas por separado aumentan la frecuencia de disparo a potenciales despolarizados. El efecto excitatorio de la muscarina se explica por reducción en la amplitud del PPH que sigue a cada PA: Estudios previos han mostrado que durante el PPH participan de manera importante corrientes de potasio dependientes de la entrada de Ca^{++} de los tipos SK y BK (Pineda et al., 1995; Blatz y Magleby, 1987; Miller et al., 1985; Sah y McLachlan, 1992; Storm, 1987) así como los canales de Ca^{++} de tipo N y P/Q que son los responsables de activar estas corrientes (Vilchis et al., 1999; Pérez-Garci et al, 2003).

Adicionalmente, se sabe que la activación de receptores muscarínicos disminuye estas corrientes de Ca^{++} (N y P/Q) (Pérez-Rosello et al., 2002; Surmeier et al., 1999). Por tanto, la acción muscarínica sobre la frecuencia de disparo neuronal se ha explicado por una reducción en la amplitud del PPH que sigue a los PAs como consecuencia de una reducción de la entrada de Ca^{++} que activa las corrientes de potasio (Vilchis et al., 1999). La disminución del PPH, puede ser imitada por la aplicación de análogos del diacilglicerol (DAG), lo cual sugiere la activación de la vía de la PKC a través de receptores muscarínicos principalmente del tipo M1 (Pineda et al., 1995).

El efecto excitatorio sobre la frecuencia de disparo del agonista dopaminérgico del tipo D1 se explica por la generación de mesetas despolarizantes persistentes que facilitan el

disparo y dependen principalmente de corrientes de Ca^{++} del tipo L, pues se ha mostrado que el agonista dopaminérgico del tipo D1, SKF81297 es capaz de generar estas mesetas despolarizantes sostenidas, las cuales pueden facilitar el disparo de las NEMs y por tanto la meseta y el incremento en la frecuencia de disparo. Estos efectos pueden ser revertidos por la aplicación de antagonistas del canal de Ca^{++} del tipo L (Hernández-López et al., 1997).

También se conoce que los análogos del AMPc mimetizan los efectos producidos por la aplicación de agonistas dopaminérgicos del tipo D1, lo cual sugiere que muy probablemente la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 activa una vía de señalización que involucra a la PKA (Hernández-López et al., 1997; Schmidt et al., 1998; Flores-Hernández et al., 2000).

Cuando se invirtió el orden de aplicación de los agonistas aplicando primero el SKF81297 (agonista dopaminérgico selectivo al receptor del tipo D1), y después se aplicó muscarina, se tuvo un efecto antagónico sobre la frecuencia de disparo neuronal. Es decir, después del incremento en la frecuencia de disparo resultado de la activación del receptor del tipo D1, la frecuencia de disparo disminuyó al aplicar la muscarina. Este efecto antagónico sobre el disparo neuronal no puede ser explicado por:

- 1) Los efectos colinérgicos sobre el PPH ya que como se muestra en las figuras 20 y 21 de esta tesis la muscarina siempre redujo la amplitud del PPH (aún después de ser aplicada en presencia del agonista dopaminérgico).

- 2) Por la participación de receptores del tipo M4, los cuales se asocian a una corriente catiónica despolarizante. La cual solo podría explicar los casos en que con este orden de aplicación de los agonistas se observó sinergismo sobre la frecuencia de disparo en 5 de 13 experimentos.

3) Por haber registrado NEMs de diferentes subtipos, ya que tanto el antagonismo como sinergismo fue observado en neuronas inmunopositivas a sustancia P como inmunopositivas a encefalinas.

El efecto antagonico observado sólo se puede explicar por una posible convergencia sobre las cadenas de señalización intracelular de los receptores muscarínicos del tipo M1 y dopaminérgicos del tipo D1, en el ámbito de los canales de Ca^{++} del tipo L.

Como ya se mencionó, la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 aumentan la amplitud de la corriente de Ca^{++} del tipo L (Surmeier et al, 1995; Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997). Esta corriente esta involucrada en la generación de mesetas despolarizantes que facilitan el disparo (Hernández-López et al, 1997, Pérez-Garci et al, 2003). La activación de receptores muscarínicos del tipo M1 disminuyen tanto las corrientes de Ca^{++} de N y P/Q, como corrientes de Ca^{++} del tipo L (Pérez-Roselló, 2004).

Los experimentos realizados con las mesetas despolarizantes, ilustrados en las figuras 20 y 21, muestran un claro antagonismo en la duración de las mesetas al aplicar, en cualquier orden, los agonistas M1 y D1. Es decir, la muscarina siempre reduce y el D1 siempre incrementa la despolarización subumbral asociada a la corriente de calcio del tipo L (Hernández-López et al, 1997, Pérez-Garci et al, 2003).

El hecho de que la activación de receptores del tipo D1 sí pueda ejercer su efecto excitatorio (aumento de la corriente de calcio del tipo L) sobre el disparo neuronal en presencia de muscarina, pudiera estar relacionado con que las vías de señalización activadas por los agonistas (figuras 6 y 7, introducción) no interaccionan entre ellas para estos efectos.

Posiblemente, para que se de una convergencia es necesario que el canal de Ca^{++} del tipo L esté fosforilado por activación previa de la vía que involucra a los receptores del tipo

D1, así, el receptor del tipo D1 activa una proteína Gs la cual estimula la adenilato ciclasa, aumentan los niveles de AMPc, se activa la PKA (Greengard, 2001) la cual fosforila directamente al canal de calcio del tipo L, resultando en un aumento en la conductancia que de las mesetas despolarizantes que facilitan el disparo de las NEMs. Al activarse los receptores muscarínicos (muy posiblemente del tipo M1), se activa una proteína Gq/11, la cual va a estimular a la PLC (Hsu et al., 1997; Calabresi et al., 1998), esta a su vez va a favorecer la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana, dando como resultado los segundos mensajeros: DAG e IP3 (de alguna manera esto lleva a la reducción del PPH). El IP3 va a favorecer la salida de Ca^{++} de los almacenes intracelulares, lo que va a activar a la calcio calmodulina (CaMK), la calcio calmodulina cinasa que a su vez activa a la PP2B (calcineurina). Esta defosforila a DARP-32 (Svenningsson et al., 2004), dejando así desinhibida a la PP1, favoreciendo así la defosforilación del canal (Watanabe et al., 2001) (Surmeier et al., 1995; Nishi et al., 1999; Flores-Hernandez et al., 2000). Ver esquema 22.

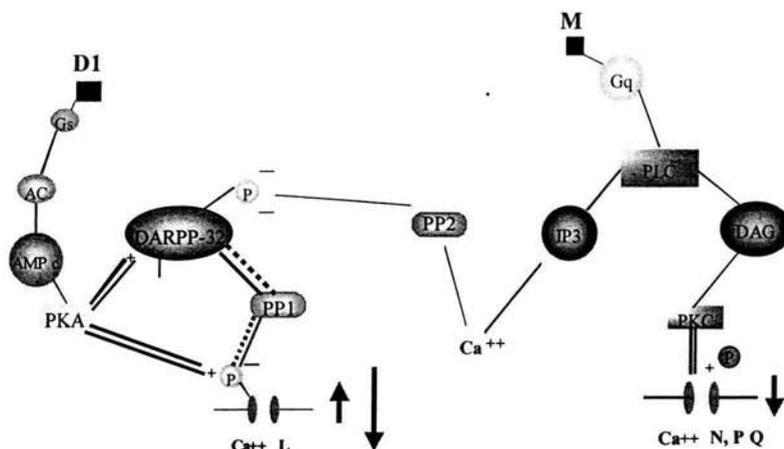


Figura 22. Esquema de las vías de señalización involucradas en la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 y receptores muscarínicos del tipo M1. El receptor dopaminérgico del tipo D1 actúa a través de una proteína de la clase Gs la cual activa a la adenilato ciclasa produciéndose una elevación de los niveles de AMPc citosólicos, dando origen a la activación de la proteína cinasa A. La activación de la PKA tiene varias consecuencias, primero la fosforilación del canal de Ca⁺⁺ del tipo L y segundo, la fosforilación del inhibidor de fosfatasas endógeno DARPP-32, el cual al estar activado va a inhibir a la fosfatasa uno A (PP1a), lo cual va a permitir al canal de Ca⁺⁺ del tipo L estar mas tiempo fosforilado (Surmeier et al., 1995). Posteriormente la adición de muscarina (1 μM) produce la activación del receptor muscarínico, que actúa a través de una proteína de la clase Gq/11 la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), produciéndose la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en la membrana celular, dando origen a los segundos mensajeros IP3 y DAG. El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) y se produce la fosforilación de canales de Ca⁺⁺ de los tipos N y P/Q. (Svenningsson et al., 2004; Watanabe et al., 2001). El IP3 va favorecer la salida de Ca⁺⁺ de los almacenes intracelulares, lo que va a activar a la calcio calmodulina (CaMK), la calcio calmodulina cinasa que a su vez activa a la PP2B (calcineurina). Esta defosforila a DARPP-32, desinhibiendo a PP1, lo cual permitira la defosforilación del canal.

CONCLUSIONES

1) Los resultados presentados muestran que la activación de un receptor (por ejemplo: D1 o M1) puede modular varias conductancias iónicas dependiendo del potencial de membrana de la neurona. La muscarina, a través de la activación de receptores del tipo M1 y M4, modula distintas conductancias. En las neuronas que poseen ambos tipos de receptor muscarínico (40% de las neuronas registradas) la respuesta excitatoria fue muy robusta (sinergismo).

2) A potenciales de membrana hiperpolarizados la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D1 y muscarínicos del tipo M1 fue de antagonismo. Los primeros reprimían y los segundos facilitaban el disparo a través de acciones opuestas sobre el rectificador anómalo, sin importar el orden de activación de los receptores.

3) A potenciales de membrana despolarizados el orden de activación de los receptores sí fue importante, pues los efectos eran sinergistas cuando se activaba primero a los receptores del tipo M1, y antagonistas cuando primero se activaban los receptores del tipo D1.

4) Todavía nos falta mucho por conocer las acciones de los neurotransmisores DA y ACh a nivel celular para brindar opciones terapéuticas reconstitutivas más racionales. Por ejemplo, la administración de L-DOPA deja de funcionar después de cierto tiempo, y comienza a dar una serie de problemas iatrogénicos colaterales (diskinesias) cuyo origen y explicación no están claros. Nosotros pensamos que solo se podrán explicar cuando terminemos de entender las acciones relevantes de los neurotransmisores en el disparo neuronal. Sólo esto llevará en un futuro a un mejoramiento de la terapéutica para padecimientos que involucran a los GB (Eglen et al., 2001).

REFERENCIAS

- Adem A, Karlsson E (1997). Muscarinic receptor subtype selective toxins. *Life Sciences* 60: 1069-1076.
- Adem A, Jolkkonen M, Bogdanovic N, Islam A, Karlsson E (1997). Localization of M1 muscarinic receptors in rat brain using selective muscarinic toxin-1. *Brain Res Bull* 44: 597-601.
- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3: 226-230.
- Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS (2001). 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.
- Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed* 11: 39-60.
- Barbeau A (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can Med Assoc J* 87: 802-807.
- Bargas J, Galarraga E (1995). Firing response modulation in neostriatal projection neurons by cholinergic and dopaminergic agonists. In: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal neurons* (Ariano M A, Surmeier D J, eds), pp 183-191. Austin, TX: Landes.
- Bargas J, Ayala GX, Vilchis C, Pineda JC, Galarraga E (1999). Ca²⁺ activated outward currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 88: 479-488.
- Bennett BD, Wilson CJ (1999). Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci* 19: 5586-5596.
- Bennett BD, Wilson CJ (2000). Synaptology and Physiology of Neostriatal Neurons. En: *Brain dynamics and the striatal complex*. pp.111-140. Ed. Harwood academic publishers. Compilador: Miller R y Wickens J R.
- Bernard V, Normand E, Bloch B (1992). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptors genes. *J Neurosci* 12: 3591-3600.
- Bickerdike MJ, Abercrombie ED (1997). Striatal acetylcholine release correlates with behavioral sensitization in rats withdrawn from chronic amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 818-826.

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 62: 63-88.

Blatz AL, Magleby KL (1986). Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323:718-720.

Bonner TI (1989). The molecular basis of muscarinic receptors. *Trends Neurosci* 12: 149-151.

Bolam J, Bennet B (1995). Microcircuitry of the neostriatum. En: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. pp. 1-19. Ed. Springer-Verlag. Compilador: Ariano M A y Surmeier D J.

Bradley KN (2000). Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther* 85: 87-109

Brailowsky S, García-Muñoz M (1996). Neurofarmacología de la enfermedad de Parkinson: aspectos básicos. En: *Parkinson, Enfoque al Futuro*. pp.209-236. Ed. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Fondo de Cultura Económica.

Brocks DR (1999). Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective. *J Pharm Pharm Sci* 2: 39-46.

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

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

Carsi JM, Potter LT. (2000). m1-toxin isotoxins from the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) that selectively block m1 muscarinic receptors. *Toxicon* 38: 187-198.

Caulfield MP, Birdsall NJM (1998). Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279-290.

Chesselet M-F, Delfs JM (1996). Basal ganglia and movement disorders:an update. *TINS* 19: 417-422.

David DJ, Harrison MB (2002). Colocalization of dopaminergic and muscarinic receptor subtypes on medium spiny striatal neurons in the rat. Program No.63.1.2002. Abstract Viewer/Intinerary planner. Washington DC: Society for neuroscience. CD-ROM.

Desmurget M, Grafton ST, Vindras P, Grea H, Turner RS (2004). The basal ganglia network mediates the planning of movement amplitude *Eur J Neurosci* 19: 2871-2880.

Distasi C, Di Gregorio F, Gilardino A, Lovisolo D (2002). A calcium-permeable channel activated by muscarinic acetylcholine receptors and InsP3 in developing chick ciliary ganglion neurons. *Biochim Biophys Acta* 1590: 109-22.

Dotz HU, Misgeld U (1986). Muscarinic excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum. *J Physiol (Lond)* 380: 593-603.

Eglen RM, Choppin A, Watson N (2001). Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 22: 409-414.

Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Cheramy A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J, Nestler EJ, Greengard P (1998). DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281: 838-842.

Figuroa A, Galárraga E, Bargas J (2002). Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46: 215-223.

Flores-Hernandez J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ (2000). D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* 83: 2996-3004.

Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández J, Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100: 239-249.

Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Barral J, Bargas J (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca²⁺ conductance. *Neuroreport* 8: 2183-6.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J (1999a). Cholinergic modulation of neostriatal output: A functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19: 3629-3638.

Galarraga E, Hernández-López S, Tapia D, Reyes A, Bargas J (1999b) Action of substance P (neurokinin-1) receptor activation on rat neostriatal projection neurons. *Synapse* 33: 26-35.

Gardiner TW, Nelson RJ (1992). Striatal neuronal activity during the initiation and execution of hand movements made in response to visual and vibratory cues. *Exp Brain Res* 92: 15-26.

Gerfen CR (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 285-320.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma Jr, Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1435.

Gerfen CR (2000). Insights from gene regulation into the functional role of dopamine in the striatum. En: *Brain dynamics and the striatal complex*. pp.179-193. Ed. Harwood academic publishers. Compilador: Miller R y Wickens J R.

Girault JA, Greengard P (2004). The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol*. 61: 641-4.

Graybiel A, Aosaki T, Flaherty A, Kimura M (1994). The basal ganglia and adaptative motor control. *Science* 265: 1826-1831.

Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A (1998). The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Rev* 26: 274-284.

Greengard P (2001). The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep* 21: 247-69.

Guerineau NC, Bossu JL, Gahwiler BH, Gerber U (1995). Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* 15: 4395-407.

Harvey AL, Kornisiuk E, Bradley KN, Cervenansky C, Duran R, Adrover M, Sanchez G, Jerusalinsky D (2002). Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinceptors. *Neurochem Res* 27: 1543-54.

Hely MA, Fung VS, Morris JG (2000). Treatment of Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 7: 484-94.

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

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

Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurones by modulating an L-Type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci* 17: 3334-3342

Hernández-López S, Tkatch T, perez-Garci E, Galárraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier J D (2000). D2 Dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCB 1-IP3- Calcineurin-Signaling cascade. *J Neurosci* 24: 8987-8995.

Hersch SM, Gutekunst C, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI (1994). Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: Light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 14: 3351-3363.

Horikawa K, Armstrong WE (1988). A versatile means of intracellular labeling: Injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25: 1-11.

Howe A R and Surmeier D J (1995). Muscarinic receptors modulate N-P- and L type Ca⁺⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15: 458-469.

Hsu KS, Yang CH, Huang CC (1997). Carbachol induces inward current in rat neostriatal neurons through a G-protein-coupled mechanism. *Neurosci Lett* 224: 79-82.

Hurtig HI (1997). Problems with current pharmacologic treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 144: 10-16.

Ince E, Ciliax BJ, Levey AI (1997). Differential expression de D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *SYNAPSE* 27: 357-366.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rial VE, Duran R, Cervenansky C (2000). Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 38: 747-761.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Bernabeu R, Izquierdo I, Cerveñansky C (1995). Muscarinic toxins from the venom of dendroaspis snakes with agonist-like actions. *Toxicom* 33: 389-397.

Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P, Adem A (2000). Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82: 793-806.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18: 527-35. Review.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson P (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10: 3421-3438.

Kitano K, Câteau H, Kaneda K, Nambu A, Takada M, Fukai T. (2002). Two-state membrane potential transitions of striatal spiny neurons as evidenced by numerical simulations and electrophysiological recordings in awake monkeys. *J Neurosci* 22:RC230 1-6.

Kiyatkin EA, Rebec GV (1996). Dopaminergic modulation of glutamate induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. *J Neurophysiol* 75: 142-153.

Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype specific antibodies. *J Neurosci* 11: 3218-3226.

Liang JS, Carsi-Gabrenas J, Krajewski JL, McCafferty JM, Purkerson SL, Santiago MP, Strauss WL, Valentine HH, Potter LT (1996). Anti-muscarinic toxins from *Dendroaspis angusticeps*. *Toxicon* 34: 1257-1267.

Max SI, Liang JS, Potter LT (1993). Stable allosteric binding of m1-toxin to m1 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 44:1171-1175.

Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985). Charibdotoxin a protein inhibitor of single Ca^{++} activates K^{+} channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-318.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors : From Structure to fuction. *Physiological Reviews* 78: 189-225.

Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z, Surmeier DJ (1998). Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* 18: 6650-6661.

Murer MG, Tseng KY, Kasanetz F, Belluscio M, Riquelme LA (2003). Brain oscillations, medium spiny neurons, and dopamine. *Cell Mol Neurobiol* 22: 611-32.

Nasman J, Jolkkonen M, Ammoun S, Karlsson E, Akerman KE (2000). Recombinant expression of a selective blocker of M(1) muscarinic receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 271: 435-439.

Nishi A, Snyder GL, Nairn AC, Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17: 8147-8155.

Nishi A, Snyder GL, Nairn AC, Greengard P (1999). Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J Neurochem* 72: 2015-2021.

Olianas MC, Adem A, Karlsson E, Onali P (1998). Identification of rat brain muscarinic M4 receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *Eur J Pharmacol* 357: 235-242.

Pasik P, Pasik T, Holstein GR (1989). The ultrastructural chemoanatomy of the basal ganglia: 1984-1989. *The basal ganglia III*. Ed. G Bernardi et al. Plenum Press, New York. P. 63-644.

Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E (1996) Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 110: 205-211.

Pérez-Garci E (2003). Caracterización de la modulación del patrón de disparo de la neurona espinosa mediana del neostriado, por la activación del receptor dopaminérgico tipo D2. Tesis doctoral en ciencias biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 86pp.

Pérez-Roselló T, Vilchis C, Salgado H, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J (2002). Modulación muscarínica de las corrientes de Ca⁺⁺ de tipo N y P/Q en las neuronas neostriatales de proyección. Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima, Colima-México.

Pineda JC, Galárraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992). Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68: 287-294.

Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J, Galarraga E (1995). Muscarinic receptors modulate the afterhiperpolarising potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281: 271-227.

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2003). Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 45: 45-56.

Plenz D, Kitai S (1998). Up and down states in striatal medium spiny neurons simultaneously recorded with spontaneous activity in fast-spiking interneurons studied in cortex-striatum-substantia nigra organotypic cultures. *J Neurosci* 18: 266-283.

Potter LT (2001). Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. *Life Sci* 68: 2541-2547.

Potter LT, Ferrendelli CA, Hanchett HE (1988). Two affinity states of M1 muscarine receptors. *Cell Mol Neurobiol* 8: 181-191.

Potter LT, Purkerson SL (1995). Pharmacology of striatal cholinergic receptors. En: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. pp. 241-254. Ed. Springer-Verlag. Compilador: Ariano M A y Surmeier D J.

Potter LT, Flynn DD, Liang JS, McCollum MH (2004). Studies of muscarinic neurotransmission with antimuscarinic toxins. *Prog Brain Res* 145:121-128.

Purkerson SL, Potter LT (1998). Use of antimuscarinic toxins to facilitate studies of striatal m4 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp. Ther* 284: 707-713.

Rao G, Fisch L, Srinivasan S, D'Amico F, Okada T, Eaton C, Robbins C (2003). Does this patient have Parkinson disease? *JAMA* 289: 347-53. Review.

Rebec GV (2000). Stimulants and motor-related striatal neuronal activity. En: *Brain dynamics and the striatal complex*. pp.51-61. Ed. Harwood academic publishers. Compilador: Miller R y Wickens J R.

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

Rolls ET, Thorpe SJ, Boytun M, Szabo I, Perrett DI (1984). Responses of striatal neurons in the behaving monkey. 3. Effects of iontophoretically applied dopamine on normal responsiveness. *Neuroscience* 12: 1201-12.

Sah P, McLachlan EM (1992). Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in the rat vagal motoneurons. *J Neurophysiol* 68: 1834-1840.

Salgado H, Vilchis C, Pérez-Roselló T, Galárraga E, Bargas J (2002). La activación del receptor dopaminérgico D2 modula corrientes de calcio de tipo P/Q, en las neuronas neostriatales de proyección. *Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Universidad de Colima, Colima-México.

Schmidt U, Pilgrim C, Beyer C (1998). Differentiative effects of dopamine on striatal neurons involve stimulation of the cAMP/PKA pathway. *Mol Cell Neurosci* 11: 9-18.

Shen KZ, North RA (1992). Muscarine increases cation conductance and decreases potassium conductance in rat locus coeruleus neurons. *J Physiol Lond* 455: 471-485.

Shi LH, Luo F, Woodward DJ, Chang JY (2004). Neural responses in multiple basal ganglia regions during spontaneous and treadmill locomotion tasks in rats. *Exp Brain Res*. 2004 Apr 6.

Sibley D (1995). Molecular biology of dopamine receptors. En: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. pp. 255-271. Ed. Springer-Verlag. Compilador: Ariano M A y Surmeier D J.

Smiley JF, Levey AI, Mesulam MM (1999). m2 muscarinic receptor immunolocalization in cholinergic cells of the monkey basal forebrain and striatum. *Neuroscience* 90: 803-814.

Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P. (1998). A dopamine /D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18: 10297-10303.

Stern MB, Freese A (1997). Parkinson's disease: the case for novel treatment strategies. *Exp Neurol* 144: 2-3.

- Strom JF (1987). Action potential repolarization and fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385: 733-759.
- Stoof J C, Vermeulen EA, Royen V, Drukarch B, Voorn P, Wolters EC, Groenewegen HJ (1996). Dopaminergic systems and Parkinson's disease: some latest developments. *Neuroscience research communications* 18: 133-142.
- Surmeier DJ., Howe AC, Russell HC (1995). Dopaminergic and cholinergic modulation of calcium conductances in neostriatal neurons. En: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function*. pp. 193-215. Ed. Springer-Verlag. Compilador: Ariano M A y Surmeier D J.
- Surmeier DJ, Song Wen-Jie, Yan Z (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16: 6579-6591.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269-96.
- Trytek ES, White IM, Schroeder DM, Heidenreich BA, Rebec GV (1996). Localization of motor- and nonmotor-related neurons within the matrix-striosome organization of rat striatum. *Brain Res* 707: 221-227.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 24: 125-132.
- Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, Waelbroeck M, Jolkkonen M, Oras A, Karlsson E (1995). Purification and sequence determination of a new muscarinic toxin (MT4) from the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *Toxicon* 33: 1171-1179.
- Vergara R, Rick C, Hernández-López, S, Laville JA, Guzmán JN, Galárraga E y Surmeier DJ (2003). Membrane potential oscillations of striatal médium spiny neurons in a corticostriatal slice. *J Physiol* 553: 169-182.
- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E (2000). Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺ dependent K⁺ currente in neostriatal neurons. *Neurosci* 95: 745-752.
- Wang JQ, Jolkkonen M, McGinty JF (1997). The muscarinic toxin 3 augments neuropeptide mRNA in rat striatum in vivo. *European Journal of Pharmacology* 334: 43-47.
- Watanabe T, Huang HB, Horiuchi A, da Cruze Silva EF, Hsieh-Wilson L, Allen PB, Shenolikar S, Greengard P, Nairn AC (2001). Protein phosphatase 1 regulation by inhibitors and targeting subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3080-3085.

Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990). Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptors mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7050-7054.

West MO, Peoples LL, Michael AJ, Chapin JK, Woodward DJ (1997). Low-dose amphetamine elevates movement-related firing of rat striatal neurons. *Brain Res* 745: 331-5.

Wilson CJ (1990). Basal Ganglia. In: Shepherd G, M. (ed). *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, Oxford.

Wilson CJ (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 277-297.

Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16: 2397-2410.

Wilson CJ (1998). Basal Ganglia. . En: *The synaptic organization of the brain*. 329-375. Ed. Oxford university press. Compilador: Gordon M Shepherd.

Wickens JR, Wilson CJ (1998). Regulation of action-potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo. *J Neurophysiol* 79: 2358-64.

Wooten GF (2001). Anatomy and function of dopamine receptors: understanding the pathophysiology of fluctuations in Parkinson's disease. *Parkinson's and related disorders* 8: 79-83.

Wu Y, Parent A (2000). Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human. *Brain Res* 863: 182-191.

Yan Z, Surmeier DJ (1996). Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16: 2592-2604.

Yan Z, Flores-Hernandez J, Surmeier DJ (2001). Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neurosci* 103: 1017-1024.

Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM (2000). Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 7: 240-250.

Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002). Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22: 1709-1717.