



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

MODULACIÓN MUSCARÍNICA DE LOS CANALES DE
 Ca^{2+} EN LAS NEURONAS ESTRIATALES DE ROEDOR

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
TERESA HERNÁNDEZ FLORES

TUTOR: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MIEMBROS DE COMITÉ TUTORAL
DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. STEFAN MIHAILESCU LUCIAN FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2015



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis Doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz en el Departamento de Neurociencia Cognitiva (laboratorio BL-103) de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José Bargas Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Elvira Galarraga Palacio	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Stefan Mihailescu Lucian	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce el apoyo técnico del Fis. Antonio Laville y del biólogo Dagoberto Tapia, así como la asesoría técnica de la Dra. Claudia Rivera, jefa del bioterio del Instituto de Fisiología Celular y la asistencia de la M. en C. Gabriela Xochitl Ayala, la M. en C. Adriana Hernández Becerril y la bióloga Ariadna Aparicio Juárez en el manejo y reproducción de los animales transgénicos.

También a Ana María Escalante y Francisco Pérez Eugenio de la unidad de cómputo por los servicios prestados.

Al apoyo y paciencia de Miriam Morales, Sara Noguera y la Sra. Conchita.

Este proyecto fue apoyado por Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM IN-202814 y IN-202914, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) 154131 y CONACyT - Deutsche Forschungsgemeinschaft. (CONACyT-DFG) donativo I0110/193/10 FON.INST.-29-10 otorgado a J. Bargas.

Durante los estudios de Doctorado conté con una beca otorgada por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de la presente tesis.

Jurado de examen:

Presidente: Dr. David García Díaz	Facultad de Medicina
Secretario: Dr. José Bargas Díaz	Instituto de Fisiología Celular
Vocal Dr. Juan Carlos Gómora Martínez	Instituto de Fisiología Celular
Vocal Dr. Salvador Hernández López	Facultad de Medicina
Vocal Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray	Unidad de Biomedicina FES-I

A
Juan Pablo

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Irma Flores Torres y José de Jesús Hernández Montealegre, por su confianza y apoyo incondicional. Los quiero.

A mis hermanos: Claudia y José de Jesús Hernández Flores porque siempre están conmigo sin importar lo que pase, los quiero.

A mi sobrino Juan Pablo, por iluminar mi vida y recordarme que no debo darme por vencida, te quiero mucho.

A mis Abuelitos: Tere, Vicente y Anita. Aunque ya no estén conmigo.

A mi tutor: Dr. José Bargas Díaz, por sus enseñanzas, apoyo y amistad.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Elvira Galarraga Palacio y el Dr. Stefan Mihailescu Lucian, por el interés y asesoramiento en la realización de este trabajo.

Al Dr. Antonio Laville Conde por la asesoría técnica y amistad.

A mis maestros: Dra. Azucena Pérez Burgos, el Dr. G. Aleph Prieto y compañero de formación Dr. Omar Hernández González. Por el aprendizaje y su amistad.

Al M en C. Ernesto Alberto Rendón Ochoa, por estos años de trabajo, aprendizaje, amistad y convivencia.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios BL-103 y BL-101 del IFC, en particular a Esther, Mariana, Silvia y Ari.

A Belén por su incondicional apoyo en especial en los últimos momentos.

A mis amigas Lupita y Ada, por acompañarme en el camino todos estos años.

A mi tía Quica, a Rafael y Fabiola por abrirme las puertas de su casa al inicio de mi doctorado.

A mis tíos Teresa y Javier por recibirme y quererme como otra hija.

ÍNDICE

ABREVIACIONES

RESUMEN

SUMMARY

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ganglios Basales

1.1.2 Neostriado

1.2 Moduladores

1.2.1 Dopamina

1.2.2 Acetilcolina

1.2.2.1 Receptores muscarínicos

1.2.2.1.1 Receptores tipo M₄

1.2.2.2 Farmacología de los receptores muscarínicos

1.3 Canales de Ca²⁺

1.3.1 Modulación muscarínica de los canales de Ca²⁺

1.3.1.1 Modulación delimitada a membrana

1.3.1.2 Modulación mediada por segundos mensajeros

1.3.1.3 Modulación mediada por hidrólisis de fosfoinosítidos

1.4 Enfermedad de Parkinson

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

3.2 Objetivo general

3.3 Objetivos particulares

4. MÉTODOS

4.1 Obtención de rebanadas y células disociadas

4.2 Registros en fijación de voltaje

4.3 Registros en fijación de corriente

4.4 Imagenología de calcio

4.5 Fármacos y materiales

4.6 Análisis de datos

5. RESULTADOS

5.1 La activación de los receptores muscarínicos M₄ incrementa la corriente de Ca²⁺ en neuronas disociadas estriatales de la *vía directa*.

- 5.2 La activación de los receptores muscarínicos M_4 incrementa la corriente a través de canales Ca_v1
- 5.3 El incremento de la corriente de Ca^{2+} tipo Ca_v1 por los receptores M_4 induce un aumento de la excitabilidad en las neuronas de la *vía directa*.
- 5.4 La activación de los receptores muscarínicos M_4 aumenta selectivamente la excitabilidad de las neuronas de la *vía directa* durante la actividad de circuito
- 5.5 Interacciones entre los receptores muscarínicos M_4 y dopaminérgicos D_1

6. DISCUSIÓN

- 6.1 Modulación de los canales Ca_v1 por los receptores muscarínicos M_4
- 6.2 Posible relevancia fisiológica

7. BIBLIOGRAFÍA

8. ANEXO 1

ABREVIACIONES

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BAC	Bacterial artificial chromosome; cromosoma bacteriano artificial
CaM	Calmodulina
CCDV	Canales de calcio dependientes o activados por voltaje
ChAT	Colina acetil transferasa
CaMKII	Proteína cinasa II regulada por Ca^{2+} /calmodulina
CS	Colículo superior
D₁Rs	Receptores dopaminérgicos D ₁
D₂Rs	Receptores dopaminérgicos D ₂
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DHP	Dihidropiridinas
dNEP	Neurona estriatal de proyección de la <i>vía directa</i>
dStr	Estriado dorsal
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein; Proteína verde fluorescente
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> . Receptor acoplado a proteínas G
GB	Ganglios basales
GDP	Guanosin difosfato
GPe	Globo Pálido externo
GPi	Globo Pálido interno
GTP	Guanosin trifosfato
HVA	High voltage activated; activados a voltajes “elevados”
I_h	Conductancia activada por hiperpolarización
iNEP	Neurona estriatal de proyección de la <i>vía indirecta</i>
IP₃	Inositol trifosfato
LVA	Low voltage activated; Activados a “bajos” voltajes
mACh-R	Receptores muscarínicos
M₁Rs	Receptores muscarínicos M ₁
M₄Rs	Receptores muscarínicos M ₄
MT-1	Toxina muscarínica 1
MT-3	Toxina muscarínica 3
MT-7	Toxina muscarínica 7
NMDG	N-Metil-D-Glucamina
NPP	Núcleo pedúnculo pontino
NS	No significativo ($P > 0.05$)
NST	Núcleo subtalámico
NEPs	Neuronas estriatales de proyección
PA	Potencial de acción
PAM	Positive allosteric modulator; Modulador alostérico positivo
PI(4,5)P₂	Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLCβ	Fosfolipasa C β
PPH	Postpotencial hiperpolarizante
PTX	<i>Toxina Pertussis</i>
RLM	Región locomotora mesencefálica
SNC	Sistema nervioso central
Snc	Sustancia nigra compacta
SNr	Sustancia nigra reticulata
TDL	Núcleos tegmentales dorsolaterales
TTX	Tetrodotoxina

RESUMEN

Los modelos sobre la función de los ganglios basales (GB) postulan un balance dinámico entre dos clases de neuronas estriatales de proyección (NEPs): las neuronas de la vía directa (dNEPs) que facilitan los movimientos y las neuronas de la vía indirecta (iNEPs) que inhiben la ejecución de movimiento. Existen dos neurotransmisores moduladores principales que regulan la eferencias de estas neuronas: dopamina (DA) y acetilcolina (ACh). Las dNEPS expresan receptores dopaminérgicos tipo D_1 y muscarínicos tipo M_1 y M_4 ; mientras que las iNEPs expresan receptores tipo D_2 y M_1 . Las acciones de los receptores M_1 , D_1 y D_2 ya han sido previamente reportadas de manera extensa, sin embargo, esto no ocurre con los receptores M_4 , es por ello que el presente trabajo está dedicado al estudio de los receptores M_4 y para ello se utilizaron registros en modalidad de célula entera en neuronas disociadas agudamente, el uso de herramientas farmacológicas específicas tales como toxinas del veneno de mamba (toxinas muscarínicas) y ratones transgénicos BAC D_1 o D_2 -eGFP para la identificación de neuronas de las *vías directa e indirecta*. Este estudio muestra que la activación de los receptores M_4 en presencia de muscarina aumentan la corriente de Ca^{2+} a través de los canales $Ca_v1.2,3-L_{C,D-}$ en dNEPs, sin embargo, esto no ocurre en iNEPs. Este efecto incrementa la excitabilidad de las dNEPs ya sea al inyectar corriente directa o bien con estimulación sináptica. El aumento en la corriente de Ca^{2+} y de la excitabilidad son bloqueados específicamente por la toxina muscarínica -3 (MT-3), sugiriendo que los receptores M_4 son responsables de estos efectos. La activación de los receptores M_4 también incrementó la actividad de red de las dNEPs, pero no de las iNEPs, tal como

se observó con imagenología de calcio. Adicionalmente, se observó que existe interacción entre los receptores M_4 y D_1 expresados en dNEPs y cuyos efectos pueden producir una mayor potenciación de la excitabilidad o paradójicamente oponerse uno al otro dependiendo el orden de su activación. En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de los receptores M_4 incrementa la excitabilidad de la *vía directa* de manera selectiva, y por ello se plantea que los receptores M_4 ayudarían a recuperar la actividad en condiciones patológicas como la Enfermedad de Parkinson donde la ausencia de DA crea un desbalance donde la actividad de la *vía directa* está reducida y exacerbada en la *vía indirecta*. Por lo tanto, se propone que el uso de drogas colinérgicas específicas podrían mejorar los síntomas de la enfermedad.

SUMMARY

Models of basal ganglia (BG) function postulate a dynamic balance between two classes of striatal projection neurons (SPNs): direct pathway neurons (dSPNs) that facilitate movements, and indirect pathway neurons (iSPNs) that repress movement execution. Two main modulatory transmitters regulate the output of these neurons: dopamine (DA) and acetylcholine (ACh). dSPNs express D₁-type DA, M₁- and M₄-type ACh receptors, while iSPNs express D₂-type DA and M₁-type ACh receptors. Actions of M₁-, D₁-, and D₂-receptors have been extensively reported, but we still ignore most actions of muscarinic M₄-type receptors. Therefore this thesis was dedicated to study the M₄-type receptors. Here we used whole-cell recordings in acutely dissociated neurons, specific pharmacological tools such as mamba-toxins, and BAC D₁ or D₂-eGFP transgenic mice to identify *direct* or *indirect pathway* neurons. Here we showed that activation of M₄-type receptors with bath applied muscarine enhanced Ca²⁺-currents through Ca_v1.2,3-L_{C,D} -channels in dSPNs but not in iSPNs. This action increased the excitability of dSPNs after both direct current injection and synaptically driven stimulation. The enhancement in Ca²⁺-current and excitability were blocked specifically by mamba toxin-3 (MT-3), suggesting mediation via M₄-type receptors. M₄-receptor activation also increased network activity of dSPNs but not of iSPNs as seen with calcium-imaging techniques. Moreover, an interaction between D₁-type and M₄-type receptors in dSPNs was observed and their effects may add to produce a larger enhancement of excitability of dSPNs or, paradoxically, oppose each other depending on the order of their activation. Together these results suggest that the activation of M₄-type receptor

increases excitability of the direct pathway selectively, and therefore it is proposed they may help to recover activity in pathological conditions such as Parkinson's Disease where the absence of dopamine creates an imbalance where the activity of the direct pathway is reduced and is augmented in the indirect pathway. Therefore, it is proposed that the use of specific cholinergic drugs may improve symptoms of the disease.

1. INTRODUCCIÓN

La ejecución de movimientos es de vital importancia para los animales, ya que permite la interacción con el medio exterior así como la adaptación al mismo. El cumplimiento de necesidades esenciales necesita de circuitos innatos como la locomoción, el ajuste de la postura, la respiración, los movimientos oculares, la alimentación, la masticación, la deglución y comportamientos motores reproductivos, entre otros (Grillner *et al.*, 2005). Los movimientos dados por los circuitos innatos, llamados “Centros Generadores de Pautas” (“*Central Pattern Generators*”) son en gran medida controlados por los ganglios basales y son sujetos a cambios por la plasticidad sináptica.

Pero en los ganglios basales también se adquieren circuitos nuevos por medio de la plasticidad sináptica. Se piensa que estos núcleos contienen la memoria de procedimientos, que cuando se convierten en automáticos con la práctica se convierten en hábitos y habilidades (Graybiel, 2008). Aun más, ciertos movimientos nunca se vuelven estereotipados y nos sirven para alcanzar metas (“*goal oriented*”) después de la toma de decisiones.

Gran parte de estos movimientos son controlados por el cerebro a través de diferentes estructuras como las cortezas motora, pre-motora, motora suplementaria, el cerebelo y por supuesto los ganglios basales (Wichmann y DeLong, 2013). Las llamadas asas corticobasales son esenciales para llevarlos a cabo (DeLong y Wichmann, 2007).

En neurociencias cognitivas a los movimientos de los primeros dos tipos se les llama “*model free*” o “libres de modelo”: el individuo no tiene que realizar un esfuerzo mental para realizarlos pues son en gran medida

estereotipados o automáticos. A los movimientos del segundo tipo se les llama “model based” o “basados en modelo”, pues el individuo tiene que hacer acopio de su representación interna del contexto y el problema, hacer un esfuerzo mental y tomar una decisión antes de ejecutarlos; “voluntarios”. En todos estos tipos de movimiento intervienen los ganglios basales y es objeto de discusión si estos poseen circuitos paralelos para cada tipo (Dolan y Dayan, 2013).

1.1 Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son estructuras subcorticales parte del prosencéfalo que consisten en núcleos motores evolutivamente conservados formando circuitos recurrentes críticos para la motivación, la selección de acciones motoras, cognitivas y de memoria (Gerfen y Surmeier, 2011, Kreitzer, 2009, Redgrave *et al.*, 1999; Wichmann y DeLong, 2003). Estos incluyen las siguientes estructuras: el neostriado (formado por los núcleos caudado y putamen), que es el principal núcleo de entrada y proyecta hacia los núcleos de salida, y el núcleo subtalámico (NST) que es el otro núcleo de entrada. Los núcleos de salidas con el globo pálido interno (GPi) o núcleo entopeduncular en el roedor y la sustancia nigra reticulata (SNr) que proyectan al tálamo y de ahí a la corteza, o bien, al tallo cerebral. Hay un núcleo intermedio: el globo pálido (globo pálido externo en el primate, GPe), que forma un circuito recurrente con el núcleo subtalámico (NST) (Bolam *et al.*, 2000, Wichmann y DeLong, 2003; Gerfen y Surmeier, 2011) y posee múltiples aferentes y proyecciones.

Los GB participan en la regulación de la función motora. Los movimientos voluntarios son iniciados en el circuito motor a nivel cortical, el

cual envía salidas hacia médula espinal, núcleos del mesencéfalo y varios núcleos subcorticales como el tálamo, el NST y el neostriado (Wichmann y DeLong, 2003; ver la figura 1).

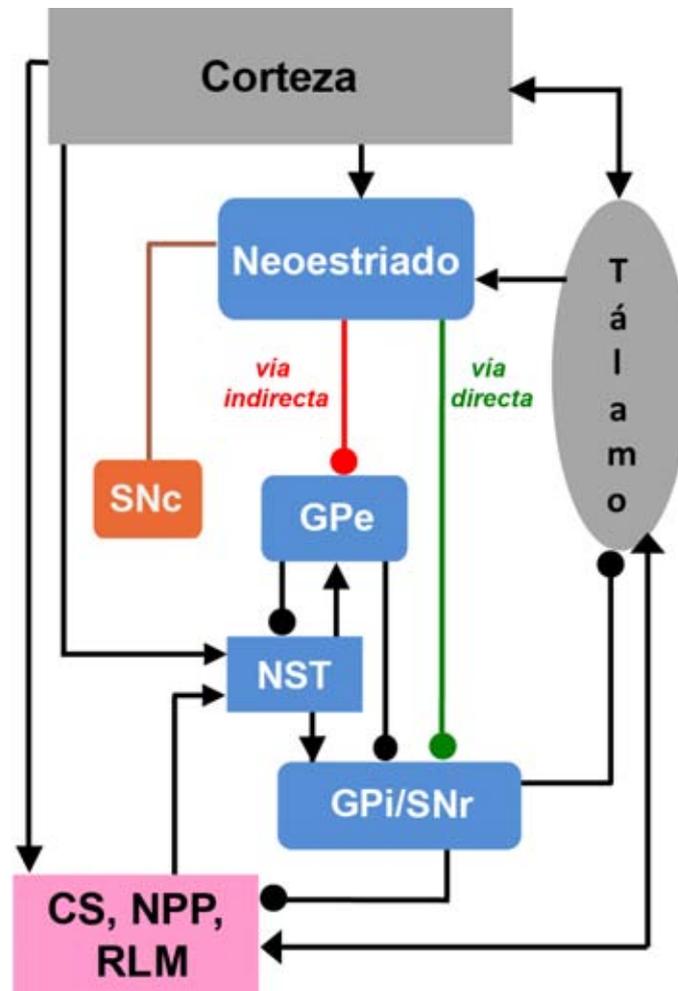


Figura 1. Circuitos cortico-estriales. Los ganglios basales (GB: en azul) tienen dos núcleos de entrada para las aferentes de la corteza y tálamo: el neostriado y el núcleo subtalámico (NST). Los núcleos de salida de los GB son el globo pálido interno (GPI) y la sustancia nigra reticulada (SNr). El procesamiento ocurre en dos vías paralelas: la *vía directa* (línea verde) que va del neostriado directamente a los núcleos de salida, GPi/SNr, y es de tipo GABAérgica: inhibe a los núcleos de salida que producen inhibición tónica y por lo tanto, al inhibirse, se desinhibe a los circuitos tálamo-corticales y del tallo cerebral (colículo superior CS, núcleo pedúnculo pontino NPP, región locomotora mesencefálica RLM) facilitando el movimiento. La otra vía es la *vía indirecta* (línea roja) que va del neostriado hacia el globo pálido externo (GPe), forma un circuito recurrente con el NST que finalmente activa a los núcleos de salida (el neostriado inhibe al GPe y éste al NST de naturaleza glutamatérgica que a su vez excita a los núcleos de salida GPi/SNr). Por lo tanto, cuando el GPe inhibe al NST se produce la desinhibición de los núcleos de salida. Por ende, aumenta la inhibición sobre sus blancos tálamo-corticales y como resultado hay represión del movimiento (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990; Kravitz *et al.*, 2010; Aceves *et al.*, 2011). La sustancia nigra compacta (SNc) provee inervación dopaminérgica a los GB, en particular al NST (Shultz, 2007). Flechas = excitación. Círculos = inhibición.

El neostriado recibe aferencias glutamatérgicas de toda la corteza cerebral (Bolam *et al.*, 2000). Estas son integradas y procesadas en esta

estructura (Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013) y eventualmente retransmitidas a los núcleos de salida (GPi y SNr) a través de dos vías paralelas: la *vía directa* y la *vía indirecta*. Estas vías actúan en forma opuesta y en paralelo para controlar el movimiento. Por un lado, la *vía directa* promueve las acciones intencionadas, mientras que la *vía indirecta* suprime los movimientos innecesarios (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990; Gerfen, 1990; Obeso *et al.*, 2004).

El GPi y la SNr liberan el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) y disparan potenciales de acción (PAs) de manera tónica, por lo tanto, producen una inhibición constante sobre sus blancos: tálamo, colículo superior (CS) y tallo cerebral, específicamente el núcleo pedúnculo pontino (NPP) y la región locomotora mesencefálica (RLM) (Albin *et al.*, 1989, Smith *et al.*, 1998; Takakusaki *et al.*, 2003; 2004) (Fig.1). Al activarse la *vía directa*, las neuronas de proyección GABAérgicas del neostriado inhiben directamente a los núcleos de salida, lo que conduce a una desinhibición de los núcleos ventrales anteriores y laterales del tálamo resultando en la facilitación de los circuitos tálamo-corticales encargados de los movimientos. También se desinhiben los otros núcleos que reciben información del GPi y SNr; el resultado final es la facilitación de la ejecución de los movimientos. En la *vía indirecta*, la información pasa a través del GPe y NST antes de llegar a los núcleos de salida. El GPe inhibe tónicamente a las neuronas glutamatérgicas del NST. Es decir, cuando se activa la *vía indirecta*, las neuronas de proyección del neostriado inhiben a las neuronas del GPe, provocando la desinhibición del NST lo que activa a los núcleos de salida de los GB y refuerza la inhibición que ejercen sobre sus blancos. El resultado

final es la inhibición del circuito tálamo-cortical, del CS, del tallo cerebral y por lo tanto, de los movimientos (Albin *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998; Gertler *et al.*, 2008).

1.1.2 Neoestriado

El cuerpo estriado de los roedores se puede dividir en dorsal y ventral de acuerdo a su conectividad y función. El cuerpo estriado dorsal (dStr) consiste en el caudo-putamen, y el estriado ventral incluye la conjunción ventral de los núcleos caudado y putamen, al núcleo accumbens, y porciones del tubérculo olfatorio (Havekes *et al.*, 2011).

El dStr se encuentra conformado hasta en un 95% por neuronas de proyección que se caracterizan por tener un diámetro somático de 10 a 20 μm (Wilson y Groves, 1980), sus dendritas poseen gran cantidad de espinas y su axón principal deja abundantes colaterales axónicas dentro del dStr previo a su salida hacia otros núcleos de los GB (Kawaguchi *et al.*, 1990, ver figura 2).

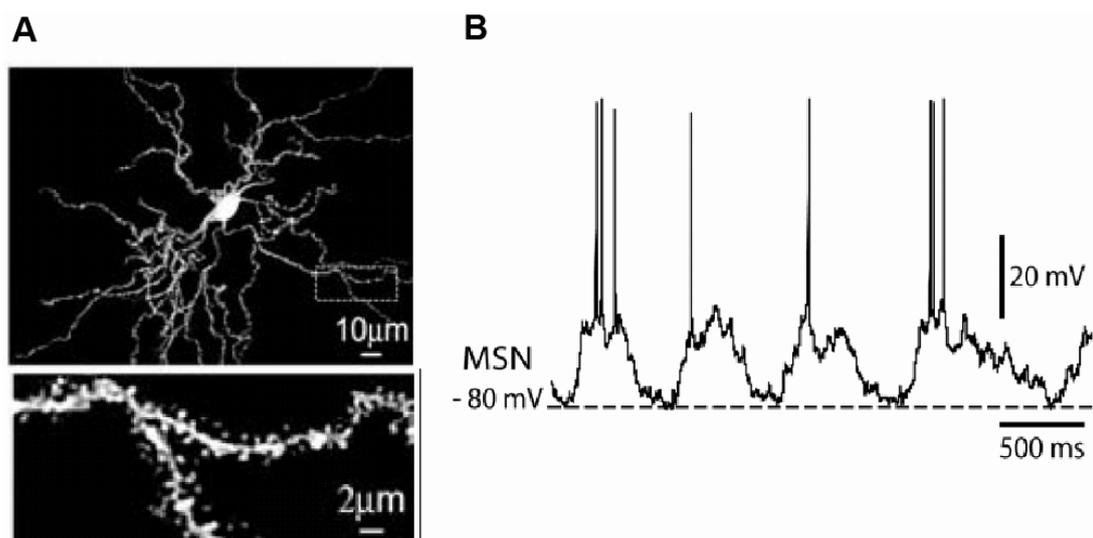


Figura 2. Neurona estriatal de proyección (NEP). A) Tinción con biocitina que muestra el soma y las dendritas (*arriba*). Se muestra además un acercamiento para apreciar las espinas (*abajo*). Modificada de Flores-Barrera *et al.*, 2009. B) Durante un registro de fijación de corriente realizado en una NEP se observa la transición entre el estado de hiperpolarizado (*down state*, -80 mV) y el estado activado (*up-state*, -55 mV). La transición al estado activado depende de una entrada convergente excitadora (glutamatérgica). Modificada de Vautrelle *et al.*, 2009.

Dadas sus características anatómicas, las NEPs también son conocidas como neuronas espinosas medianas ("*medium spiny neurons*" o MSN; Wilson, 2004). Sin embargo, muchas neuronas en el cerebro poseen dendritas espinosas, así que para fines prácticos, en el presente estudio las denominaremos neuronas estriatales de proyección (NEPs). Estas neuronas son GABAérgicas y en condiciones de reposo, su potencial de membrana se encuentra alrededor de los -85 mV, lo que se conoce como estado de reposo o inactivo ("*down-state*"). Sin embargo, en respuesta a una activación glutamatérgica convergente las NEPs se despolarizan y mantienen en un segundo potencial de membrana alrededor de los -55 mV, cercano al umbral de disparo (aproximadamente -45 mV): el estado activo ("*up-state*", figura 2; Wilson, 1993; Vergara *et al.*, 2003; Vautrelle *et al.*, 2009) .

Las NEPs se dividen clásicamente en dos grandes poblaciones: las neuronas que expresan el receptor a dopamina (DA) de tipo 1 (D₁R), que junto con el GABA co-expresan y co-liberan sustancia P y dinorfina, y que proyectan sus axones de forma monosináptica hacia los núcleos de salida: el GPi y la SNr. Por lo que es a esta proyección que se le denomina *vía directa* (dNEPs).

Las neuronas que expresan el receptor a DA de tipo 2 (D₂R), junto con el GABA co-expresan y co-liberan encefalinas, y envían sus axones al núcleo intermedio de los GB: el globo pálido externo (GPe), es decir, no proyectan directamente a los núcleos de salida, y por lo tanto se les denomina neuronas de la *vía indirecta* (iNEPs; Gerfen y Surmeier, 2011, Gerfen *et al.*, 1990; Gerfen y Young, 1988, Kreitzer, 2009).

De manera simplificada el modelo tradicional del funcionamiento de los GB se fundamenta en cómo la información que llega al neostriado es

procesada a través de las vías *directa* e *indirecta*, dos vías paralelas con funciones antagónicas (Albin *et al.*, 1989, DeLong, 1990; Obeso *et al.*, 2004, Kravitz *et al.* 2010, Gerfen y Surmeier, 2011. Figuras 1 y 3).

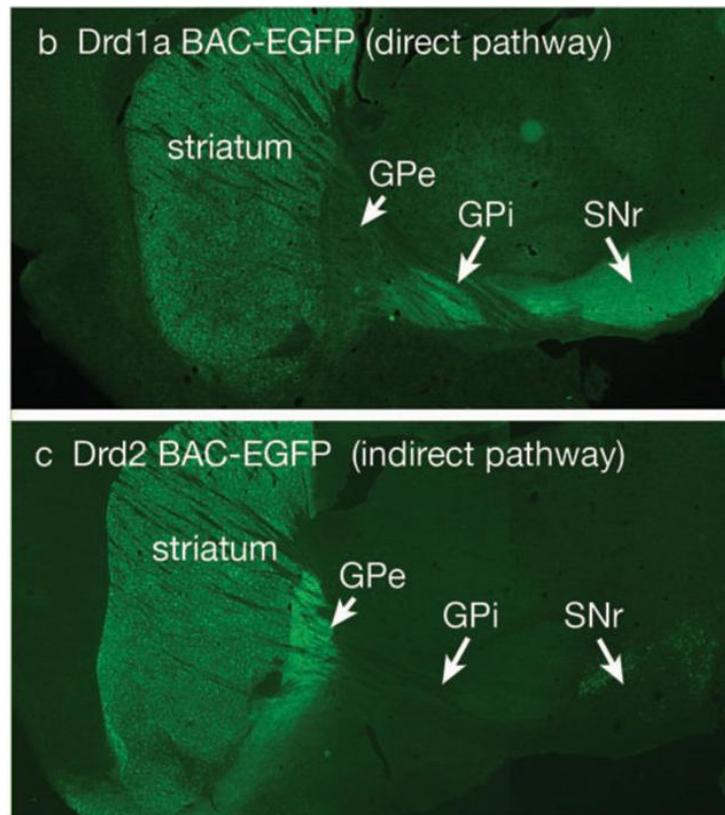


Figura 3. Vías *directa* e *indirecta* de los ganglios basales. Imágenes de rebanadas sagitales de cerebro de ratón transgénico Drd1-EGFP (arriba) y Drd2-EGFP (abajo). Cuando el reportero es asociado al receptor a DA tipo D₁ la señal fluorescente resalta en el neostriado, la SNr y el GPi, a diferencia de la señal obtenida en los animales Drd2-EGFP donde además del neostriado se marca el GPe. Tomada de Gerfen y Surmeier, 2011.

Por mucho tiempo, las NEPs de ambas vías fueron consideradas tanto morfológica como electrofisiológicamente similares, y sólo podían ser diferenciadas con base en su caracterización neuroquímica. Sin embargo, actualmente existen líneas de ratones transgénicos que permiten su identificación. Estos ratones tienen cromosomas artificiales bacterianos (bacterial artificial chromosome, BAC) que dirigen la expresión de una cierta proteína reportera (eGFP, tomato, etc.) bajo el control de los receptores D₁ o

D₂, etc. (Valjent *et al.*, 2009, Gerfen, 2006; Gerfen y Surmeier, 2011; Dobrossy *et al.*, 2011). Así, en estos roedores se observa claramente la división entre las dos vías (Figura 3) y como consecuencia, su estudio se ha facilitado. De hecho, recientemente se ha mostrado que existen diferencias electrofisiológicas entre ambas poblaciones neuronales, tales como su respuesta cortico-estriatal ante estímulos supraumbrales. La respuesta de las dNEPs es más prolongada y evoca más PAs, mientras que en las iNEPs se presenta una respuesta autorregenerativa intrínseca debida a una mayor excitabilidad dendrítica (Flores-Barrera *et al.*, 2010).

Adicionalmente, las NEPs también presentan receptores colinérgicos muscarínicos, que al igual que los receptores dopaminérgicos, se expresan de forma separada en ambas vías de proyección. Los receptores muscarínicos M₁ (M₁Rs) se encuentran en ambos tipos neuronales, mientras que los receptores M₄ (M₄Rs) se observan preferentemente en las neuronas de la *vía directa* (Goldberg *et al.*, 2012; Ince *et al.*, 1997; Santiago y Potter, 2001; Yan *et al.*, 2001, Kreitzer, 2009).

Además de las NEPs, el neostriado contiene varios tipos de interneuronas (las cuales comprenden el 5-10% de la población estriatal total en roedores): la mayoría son de naturaleza GABAérgica y el resto es colinérgica (Tepper y Bolam, 2004, Tepper *et al.*, 2010; Muñoz-Manchado *et al.*, 2014). Entre las de tipo GABAérgico se encuentran las que expresan parvalbúmina, neuropéptido Y, somatostatina, NADPH-diaforasa, óxido nítrico sintasa, calretinina y el receptor 5HT₃ (Kawaguchi *et al.*, 1995; Tepper y Bolam, 2004; Muñoz-Manchado *et al.*, 2014). Por otra parte, la interneuronas colinérgicas poseen un soma que mide de 20 a 50 μm de diámetro y

constituyen la principal fuente de acetilcolina (ACh) del neostriado (Zhou *et al.*, 2002). Esto se debe a que el axón de las interneuronas colinérgicas se ramifica profusamente formando una densa arborización (Bennet y Wilson, 2000).

Asimismo, recientemente se demostró que el neostriado recibe inervación colinérgica proveniente del tallo cerebral. El NPP ventral inerva preferencialmente al estriado dorsolateral, mientras que los núcleos tegmental dorsolaterales (TDL) proyectan al estriado medial y al núcleo *accumbens* “core” o central (Dautan *et al.*, 2014). La concentración de ACh del dStr, junto con la del estriado ventral, es la más alta del cerebro (Zhou *et al.*, 2002; figura 4).

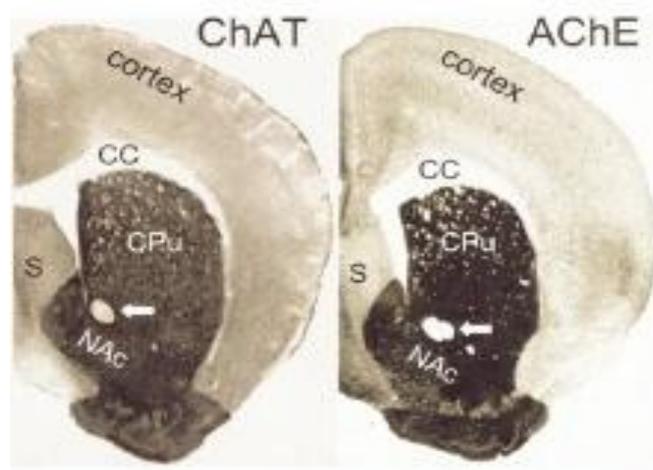


Figura 4. El NSt tiene los niveles más altos de ACh de todo el cerebro. Cortes coronales de cerebro de ratón mostrando la tinción con el anticuerpo contra colina acetiltransferasa (ChAT, siglas en inglés) y acetilcolinesterasa (AChE, siglas en inglés) en el estriado dorsal y el núcleo *accumbens*. Tomada y modificada de Zhou *et al.*, 2002

Las interneuronas colinérgicas tienen conexiones con las NEPs e interneuronas (Lim *et al.*, 2014). Sobre todo con aquellas que expresan el receptor 5-HT₃ (Muñoz-Manchado *et al.*, 2014) aunque algunos autores incluyen también a las que expresan parvalbúmina (Koos y Tepper, 2002). Las interneuronas colinérgicas presentan un pospotencial hiperpolarizante (PPH) largo debido a conductancias de K⁺ activadas por Ca²⁺ y voltaje (Wilson, 2004),

también poseen una conductancia activada por hiperpolarización (I_h) y una corriente de Na^+ persistente. La combinación de estas conductancias genera disparo espontáneo (5 Hz) en ausencia de entradas sinápticas, presentando, ocasionalmente, ráfagas rítmicas (Bennet y Wilson, 2000). Dado que tiene disparo rítmico en ausencia de entradas sinápticas y su profusa ramificación, se genera un tono basal de ACh en el neocórtex, que medido en rebanadas de cerebro a superfusión constante es de 1.5 pM (Galarraga *et al.*, 1999).

La liberación de ACh es regulada por el autoreceptor muscarínico $M_{2/4}$ presente en las terminales axónicas de estas interneuronas (figura 5). Estos receptores inhiben la entrada de Ca^{2+} a través de los canales N ($\text{Ca}_v2.2$) y P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) (Yan y Surmeier, 1996; Ding *et al.*, 2006).

La ACh liberada produce efectos excitadores complejos sobre las NEPs a través de la modulación de diversas conductancias iónicas de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ principalmente (Pineda *et al.*, 1995; Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2007; Carrillo-Reid *et al.*, 2009) y que son descritas en otra sección. Estos efectos son de suma importancia, puesto que al controlar la liberación de ACh, se modulan los sitios hacia donde las neuronas colinérgicas dirigen sus axones, regulando así, la salida de los GB y por lo tanto, la función motora.

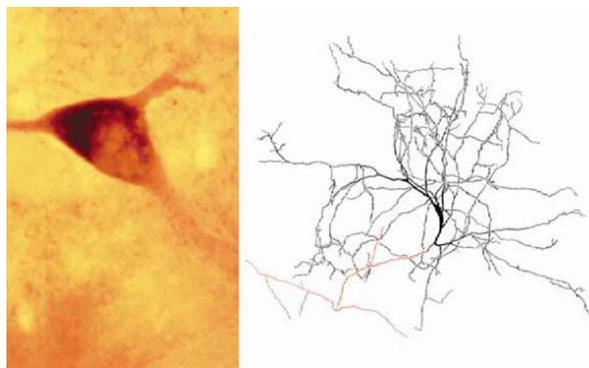


Figura 5. Interneurona colinérgica estriatal. A la izquierda, acercamiento del soma. A la derecha, reconstrucción de una interneurona colinérgica. Tomada de Tepper y Bolam, 2004. Soma y dendritas en negro. Axón en café.

1.2 Neurotransmisores Moduladores

El neostriado también presenta las más altas concentraciones basales de DA de todo el sistema nervioso central (SNC) puesto que está densamente innervado por fibras dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra *pars compacta* (SNc) y del área ventral tegmental. Las neuronas dopaminérgicas tienen actividad espontánea con disparo tónico (1-8 Hz) manteniendo así un tono de DA (Shultz, 2007). Desde las NEPs hasta las interneuronas colinérgicas, todos los elementos del neostriado expresan receptores dopaminérgicos modulando el circuito a varios niveles (Surmeier *et al.*, 1995, Centonze *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 1996, Kreitzer, 2009. Figura 6). En respuesta a un estímulo relevante las neuronas de la SNc generan disparo en ráfagas elevando los niveles de DA fásicamente (Tritsch y Sabatini, 2012). Es importante mencionar que los receptores a DA tienen diferentes afinidades al ligando por lo que durante la ausencia de estímulos el tono dopaminérgico activa preferentemente a los D₂Rs y el aumento en las concentraciones de DA promueve la activación de los D₁Rs, convirtiendo a la DA en un contrastador de señales (Shultz, 2007; Dreyer *et al.*, 2010).

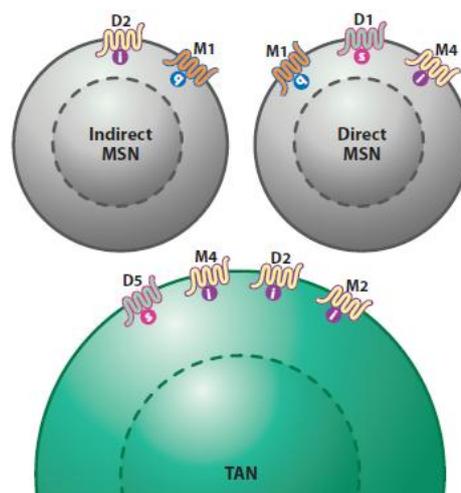


Figura 6. Receptores dopaminérgicos y colinérgico-muscarínicos de las neuronas estriadales. Esquema mostrando los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos y colinérgico-muscarínicos en las neuronas de proyección de las vías indirecta y directa (en gris), y de la interneurona colinérgica (en verde). Tomada de Kreitzer, 2009.

Se piensa que del balance entre DA y ACh depende el adecuado funcionamiento de los GB dado que ambos moduladores ejercen poderosos efectos sobre la excitabilidad de las NEPs (Ding *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2002; Aosaki *et al.*, 2010). Sin embargo, en un estado patológico como la enfermedad de Parkinson (EP), el balance se interrumpe debido a una disminución importante de los niveles de DA, lo que colapsa funcionalmente a los GB induciendo los signos y síntomas de la enfermedad (Albin *et al.*, 1995; Wichmann y DeLong, 2003). A su vez, se observa un aumento en los niveles colinérgicos (Ince *et al.*, 1997; Wilson, 2004; Ding *et al.*, 2006; Pisani *et al.*, 2007; Aosaki *et al.*, 2010).

1.2.1 Dopamina

La DA es un neurotransmisor que, en los mamíferos, lleva a cabo sus efectos a través de cinco receptores acoplados a proteínas G ("*G-protein coupled receptors*" o GPCR, en inglés) divididos en dos familias: los receptores de tipo D₁ (D₁ y D₅) y los de tipo D₂ (D₂, D₃ y D₄) (Vallone *et al.*, 2000). Los D₁Rs están acoplados a proteínas G_{α/olf} (Missale *et al.*, 1998, Neve *et al.*, 2004) que promueve la actividad de la adenilato ciclasa (AC) y la elevación de AMPc (Stoof y Keibian, 1981). Por el contrario, los D₂Rs están acoplados a proteínas G_{α/o}, que inhiben a la AC (Stoof y Keibian, 1981, Neve *et al.*, 2004) y activan a fosfolipasa C tipo β (PLCβ) (Hernández-López *et al.*, 2000. Figura 6), entre otras gestiones (Bonci y Hopf, 2005).

Entre otras acciones (Tritsch y Sabatini, 2012), la DA regula la excitabilidad de las NEPs gracias a la modulación de canales Ca_v1. Los D₁Rs facilitan la activación de los canales Ca_v1 (Galarraga *et al.*, 1997; Hernández-

López *et al.*, 1997; Surmeier *et al.*, 2011; Tritsch y Sabatini, 2012) y por ende la excitabilidad de la *vía directa*; dado que estos canales incrementan la frecuencia de disparo (Pérez-Garci *et al.*, 2003) y por consiguiente la excitabilidad neuronal. En cambio, los D₂Rs promueven la inhibición de estos canales en las iNEPs (Hernández-López *et al.*, 2000; Salgado *et al.*, 2005) dando como resultado la inhibición de la *vía indirecta* (figura 7).

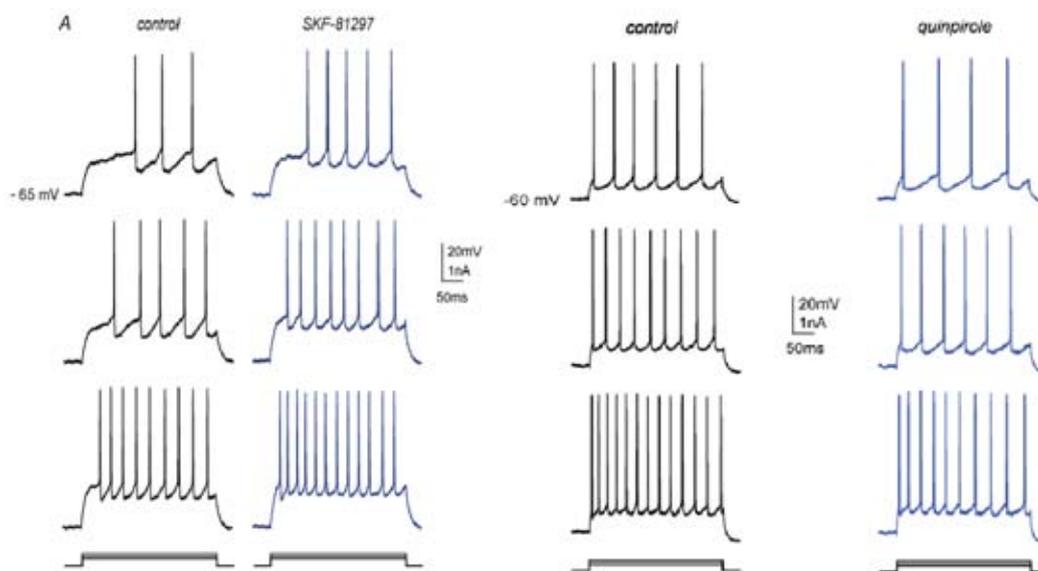


Figura 7. Modulación dopaminérgica de la frecuencia de disparo en neuronas estriatales. De arriba hacia abajo, se muestran trenes de potenciales de acción evocados por inyección intracelular de corriente de intensidad creciente. Los trazos en negro denotan la condición control, mientras que en azul en presencia de un agonista dopaminérgico. Los trazos de la izquierda provienen de una dNEP y se observa que la frecuencia de disparo se incrementa para cada estímulo luego de aplicar un agonista D₁R (SKF-81297). A la derecha se observa la disminución de la frecuencia de disparo en una iNEP dada por un agonista D₂R (quinpirole) (Hernández-López *et al.*, 1997, 2000).

1.2.2 Acetilcolina

La ACh fue la primera sustancia identificada como neurotransmisor y ha sido involucrada en casi todos los procesos cognitivos (Karczmar, 1996; Felder, 1995; Lucas-Meunier *et al.*, 2003) así como diversas funciones fisiológicas tales como el control motor y sensorial, la frecuencia cardíaca, la respuesta muscular contráctil, el peristaltismo, la secreción exocrina y endocrina, el control de la luz que llega a la retina, la micción, la preparación de los órganos sexuales para la cópula, el control del diámetro bronquial, etc. (Felder, 1995; Bradley, 2000).

Por otra parte, la disfunción colinérgica se ha implicado en trastornos patológicos y cognitivos tales como la EP, la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down (Felder, 1995; Lucas-Meunier *et al.*, 2003).

Las neuronas colinérgicas en el SNC residen en diversas estructuras que incluyen a los núcleos septales mediales, núcleos de la banda diagonal, núcleos de Meynert, NPP y neocórtex (interneuronas) (Haga, 2013; Dautan *et al.*, 2014; Luchicchi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2002).

La ACh es sintetizada en las terminales nerviosas a partir de los precursores acetil coenzima A (acetil CoA, sintetizada a partir de glucosa) y colina, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (ChAT). Una vez sintetizada, la acetilcolina es almacenada en vesículas para su posterior liberación por exocitosis, requiriendo para dicho proceso de la entrada de Ca^{2+} . Cuando se libera al espacio sináptico hace contacto con sus receptores y ejerce su efecto a acuerdo al tipo de receptor presente en la membrana postsináptica. Tras su liberación, la ACh que queda libre en el espacio sináptico es degradada a través de la acetilcolinesterasa (AChE), que la hidroliza en acetato y colina. Posteriormente, la colina puede recapturarse al botón presináptico por medio de un transportador dependiente de Na^+ presente en terminaciones colinérgicas para resintetizar ACh (Purves, *et al.*, 2004, Schwartz y Javitch, 2013). Las acciones celulares de la ACh son mediadas por dos familias estructuralmente diversas de receptores: los nicotínicos de tipo canal (denominados así porque son afines a la nicotina) y muscarínicos de tipo metabotrópico (nombrados así por su afinidad a la muscarina, un alcaloide producto del hongo *Amanita muscaria*) (Eglen, 2006; Caulfield y Birdsall, 1998; Purves, *et al.*, 2004; Schwartz y Javitch, 2013; Haga, 2013). Los receptores

muscarínicos se componen de varios subtipos y se expresan pre y postsinápticamente teniendo distribuciones discretas a lo largo de los sistemas nerviosos central y periférico (Caulfield y Birdsall, 1998, Eglen, 2006).

1.2.2.1 Receptores muscarínicos

Los receptores muscarínicos (mACh-R) están clasificados como miembros de la superfamilia de GPCR. En presencia de un agonista, las proteínas G triméricas, a las cuales se encuentran acoplados los receptores, promueven la separación de GDP y promueven la unión de GTP. El efecto del ligando sobre su receptor finaliza cuando la GTPasa de la proteína G hidroliza el GTP a GDP (Caulfield, 1993).

Los mACh-R están formados por siete segmentos transmembranales constituidos por aminoácidos hidrofóbicos, tres lazos intracelulares y tres lazos extracelulares hidrofílicos (Felder, 1995), así como un amino (N-) y un carboxilo (C-terminal) extra e intracelulares, respectivamente (Lucas-Meunier *et al.*, 2003). Hasta ahora se han clonado cinco tipos de mACh-R (M_1 - M_5) (Hulme, 1990; Caulfield, 1993; Caulfield y Birdsall, 1998; Eglen, 2006; Haga, 2013) los cuales han sido agrupados en dos familias: M_1 (que incluye los tipos M_1 , M_3 y M_5) y M_2 (con los tipos M_2 y M_4), de acuerdo a la proteína G a la cual están acoplados. Los receptores de la familia M_1 se acoplan preferentemente a la estimulación de la PLC β a través de proteínas $G_{q/11}$ insensibles a la *toxina Pertussis* (PTX). Mientras que la familia de los receptores M_2 se acopla preferentemente a la inhibición de la AC a través de proteínas de tipo $G_{i/o}$ sensibles a PTX; disminuyendo la producción de AMPc y la actividad de la

proteína cinasa A (PKA) (Caulfield y Birdsall, 1998; Nathanson, 2000; Eglén, 2006; Haga, 2013; Guo *et al.*, 2010. Figura 8).

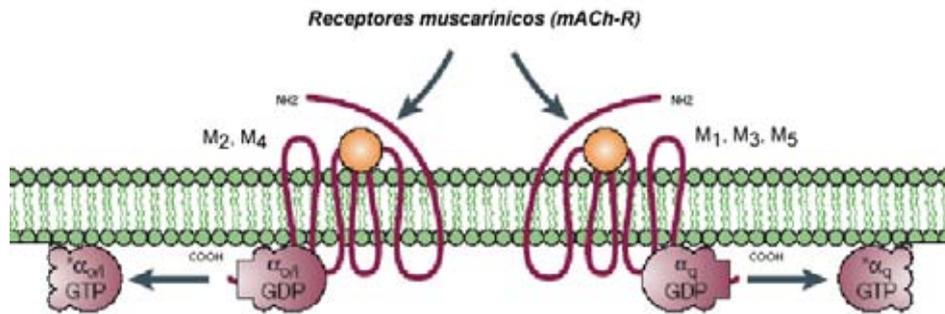


Figura 8. Esquema de los receptores muscarínicos. Los receptores muscarínicos tienen 7 segmentos transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas $G_{q/11}$ o $G_{i/o}$, según pertenezcan a la familia de receptores muscarínicos M_1 o M_2 , respectivamente. Poseen un segmento NH_2 -terminal extracelular y un $COOH$ -terminal intracelular (Tomada y modificada de Neubig y Siderovski, 2002).

La activación de la $PLC\beta$ da como resultado la hidrólisis del fosfatidilinositol (4,5) bifosfato o $PI(4,5)P_2$, uno de los fosfolípidos que conforman la membrana plasmática. Esta reacción libera inositol trifosfato (IP_3) al citosol, así como diacilglicerol (DAG) que permanece en la membrana (Caulfield, 1993; Eglén, 2006). El IP_3 favorece la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares debido a la activación de los receptores de IP_3 ubicados en la membrana del retículo endoplásmico. El Ca^{2+} , puede activar múltiples proteínas con diversos blancos intracelulares. Por su parte, el DAG activa las isoformas convencionales (α , βI , βII y γ) y novedosas (ϵ , η , δ y θ) de la proteína cinasa C (PKC), que deben traslocarse a la membrana para ser activadas (Parker y Murray-Rust, 2004). También, existen reportes de acciones secundarias al incremento de Ca^{2+} generado por la activación de receptores de la familia M_1 , tales como la liberación de ácido araquidónico (AA), y el incremento en los niveles de AMPc y GMPc. El último de los lazos intracelulares del receptor es el candidato más factible para el acoplamiento con la proteína G (Caulfield, 1993), para los receptores de la familia M_2 ,

mientras que el segundo lazo es el candidato para los de la familia M_1 (Lucas-Meunier *et al.*, 2003).

Además, se ha descrito que los receptores muscarínicos modulan (inhibiendo o activando) un gran número de canales iónicos activados por voltaje, los cuales participan en la generación del potencial de acción de las células excitables y modifican así el patrón temporal y la frecuencia de disparo, así como la liberación de neurotransmisores, entre otros procesos celulares (Suh y Hille, 2005).

Es importante mencionar que la similitud en el sitio de unión a ligando de los cinco tipos de mACh-R explica la razón por la cual la identificación de ligandos específicos ha sido históricamente difícil (Eglen, 2006; Dencker *et al.*, 2012).

1.2.2.1.1 Receptores tipo M_4

De los cinco tipos mACh-R, los M_4 Rs tienen diversas características distintivas. Primero, los M_4 Rs se expresan de forma más abundante en el neocórtex (Hersch *et al.*, 1994; Yasuda *et al.*, 1993). Segundo, dentro del córtex los M_4 Rs se encuentran co-expresados con receptores D_1 Rs en las dNEPs (Santiago y Potter, 2001; Ince *et al.*, 1997). Finalmente, los M_4 Rs están concentrados en sitios postsinápticos y pueden ser encontrados en el microdominio de la densidad postsináptica, permitiendo que estos receptores sean sensibles a los cambios de entrada sináptica, por lo que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la fuerza y la eficiencia sinápticas (Yasuda *et al.*, 1993).

Adicionalmente, se ha observado que hay zonas en los dominios intracelulares que componen a los M₄Rs que interactúan con ciertas proteínas, por ejemplo: el factor de elongación 1A2 (que inhibe la recuperación de M₄Rs en la superficie celular luego de la internalización inducida por un agonista), otros M₄Rs forman dímeros y se asocian a la proteína quinasa II regulada por Ca²⁺/calmodulina (CaMKII), etc. (ver Guo *et al.*, 2010).

1.2.2.2 Farmacología de los receptores muscarínicos

Como se mencionó previamente, los mACh-R fueron denominados así por su habilidad para unir el alcaloide muscarina (Caulfield y Birdsall, 1998). Actualmente existe un importante número de antagonistas para los diferentes mACh-R. Sin embargo, estos difieren muy poco en la selectividad que poseen para reconocer los diferentes receptores, por ejemplo, si consideramos a la pirenzepina que pese a ser considerado un “antagonista M₁”, también puede unirse al receptor M₄. Es decir, es cinco a seis veces más afín para el receptor M₁ que para el M₄ (Adem y Karlsson, 1997). Como consecuencia, la descripción de las acciones de cada uno de los receptores en diferentes tejidos se ha visto retrasada e incluso contaminada por información incoherente (Caulfield, 1993; Bradley, 2000). No obstante, recientemente se aislaron antagonistas específicos para algunos de los mACh-R, extraídos del veneno de la víbora mamba verde del este (*Dendroaspis angusticeps*) (Adem y Karlsson, 1997; Jerusalinsky *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2000; Servent y Fruchart-Gaillard, 2009; Servent *et al.*, 2011). Entre estos pequeños péptidos se encuentran la toxina muscarínica 1 (MT-1), altamente selectiva para receptores M₁ y M₄. Sin embargo, actúa como agonista para los M₁Rs y antagonista para

los M₄Rs (Harvey *et al.*, 1998). La toxina muscarínica 3 (MT-3) es un antagonista altamente afín para los M₄Rs ($K_i = 1.3$ nM) (Jerusalinsky *et al.*, 2000; Bradley, 2000; Purkerson y Potter, 1998) y la toxina muscarínica 7 (MT-7) un antagonista de gran afinidad para los M₁Rs ($K_i = 14$ nM) (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006). Todas estas toxinas presentan muy baja, o virtualmente nula afinidad para los receptores M₂, M₃ y M₅ (Jerusalinsky *et al.*, 2000). Por ello estas toxinas se han convertido en una poderosa herramienta para el estudio de los mACh-R y se han utilizado para identificar, localizar, clasificar o caracterizar farmacológica y funcionalmente sus blancos fisiológicos (Servent y Fruchart-Gaillard, 2009; Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006, Servent *et al.*, 2011; Rowan y Harvey, 2011).

Debido a que existe mucha similitud en el sitio de unión a ligando de los cinco tipos de mACh-R, los intentos para lograr la activación selectiva de mAChRs con ligandos ortostéricos (que no sean toxinas), han fracasado. Entonces, usando un enfoque alternativo, muchos laboratorios académicos y farmacéuticos están desarrollando compuestos que se unen a estos receptores en sitios alostéricos menos conservados ectópicos que son topográficamente distintos al sitio ortostérico. Estos ligandos, denominados activadores alostéricos o moduladores, proporcionan una excelente selectividad para los subtipos individuales de varios GPCR. Para los mAChRs, diversos compuestos alostéricos incluyendo tanto agonistas como moduladores alostéricos positivos (PAMs, en inglés) han sido identificados. Los PAMs son incapaces de activar directamente los receptores, pero su unión modifica la conformación del receptor que cambia la unión y/o propiedades funcionales de ligandos ortostéricos. Gracias a esta propiedades únicas, dichos compuestos podrían

tener ventajas para el tratamiento de patologías en el SNC (Digby *et al.*, 2010; Dencker *et al.*, 2012; Byun *et al.*, 2014; Shirey *et al.*, 2008). No obstante, este campo de investigación es relativamente nuevo por lo que requiere mayor estudio.

Finalmente, cabe mencionar que la mayoría de los estudios sobre la selectividad de ligandos muscarínicos ha sido realizada principalmente en poblaciones de receptores puros y homogéneos sobre-expresados en sistemas heterólogos. Lo que presenta algunos inconvenientes, ya que es difícil suponer que un tipo particular de receptor sobre-expresado en líneas celulares conservará las mismas características que el receptor nativo expresado en tejidos intactos donde además están presentes varios tipos de receptor con los cuales puede formar dímeros y/o heterómeros, o bien, modificaciones post-traducción. Por lo tanto, los datos de dichos estudios deben permanecer como indicaciones provisionales hasta ser confirmadas en experimentos funcionales en tejidos y células que expresen el tipo(s) de receptor(es) de interés (Caulfield, 1993).

Desafortunadamente, las publicaciones de este tipo de experimentos, más aún tratándose de neuronas centrales, son escasas. Sobre todo en trabajos vinculando receptores identificados con alguna función. No es de extrañar entonces que la terapéutica siga siendo, en su mayor parte, empírica.

1.3 Canales de Ca²⁺

La actividad eléctrica de las neuronas y otras células excitables se debe a diferentes tipos de canales iónicos activados por voltaje, en particular de los canales de Ca²⁺. Estos canales no sólo alteran el potencial de membrana, sino

que también funcionan como blancos de señalización (Clapham, 2007; Catteral, 2000; Simms y Zamponi, 2014). En condiciones de reposo normal, el rango de la concentración intracelular de Ca^{2+} ronda los 100 nM debido a la presencia de moléculas amortiguadoras de Ca^{2+} y reservorios intracelulares que lo almacenan activamente (Clapham, 2007). La apertura de los canales permite la entrada de Ca^{2+} siguiendo el gradiente electroquímico y por ende la elevación localizada de Ca^{2+} intracelular en el rango micromolar (Wadel *et al.*, 2007). Esto a su vez, desencadena una amplia gama de procesos dependientes de Ca^{2+} que incluyen la transcripción de genes, la liberación de neurotransmisores y la activación de enzimas dependientes de calcio, tales como CaMKII y PKC (Wheeler *et al.*, 1994; Clapham, 2007; Simms y Zamponi, 2014).

Los canales de Ca^{2+} dependientes o activados por voltaje (CCDV) son complejos heteromultiméricos que se encuentran conformados por subunidades $\alpha 1$, β , γ y $\alpha 2\delta$. La subunidad $\alpha 1$ (190-250 kDa) conforma el poro del canal, posee el filtro de selectividad para el Ca^{2+} , el sensor de voltaje y la mayor parte de los sitios conocidos para la regulación del canal (p. ej., segundos mensajeros, toxinas y drogas) (Catterall *et al.*, 2005); está formada por cuatro dominios homólogos cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6) (Doering y Zamponi, 2003); los segmentos S4 de cada dominio homólogo sirven como sensores de voltaje debido a la presencia de cargas positivas. Estos segmentos se mueven hacia afuera y giran bajo la influencia del campo eléctrico iniciando un cambio conformacional involucrado con la apertura del poro. Los segmentos S5 y S6 están conectados por un asa P re-entrante en la membrana que forma un poro permeable. Cada asa P

contiene residuos aminoácidos de glutamato de carga negativa que cooperan en la conformación del poro altamente selectivo a cationes divalentes permeantes como Ca^{2+} , Ba^{2+} y Sr^{2+} y que interactúa con cationes impermeables como el Cd^{2+} (Simms y Zamponi, 2014; Catterall, 2000). Las otras subunidades accesorias regulan las propiedades biofísicas y el tráfico de la subunidad α_1 (Arikkath y Campbell, 2003; Simms y Zamponi, 2014). La subunidad β (55 kDa) se encuentra completamente inmersa en el citoplasma, la subunidad γ (33 kDa) contiene 4 segmentos transmembranales; la subunidad $\alpha_2\delta$ (170 kDa) es un dímero comprendido por la sección δ que se une a la membrana a través de un segmento transmembranal, mientras que la parte α_2 es extracelular; el dímero está unido por un puente disulfuro generado por modificaciones post-traducción (Catterall, 2000) (ver figura 9).

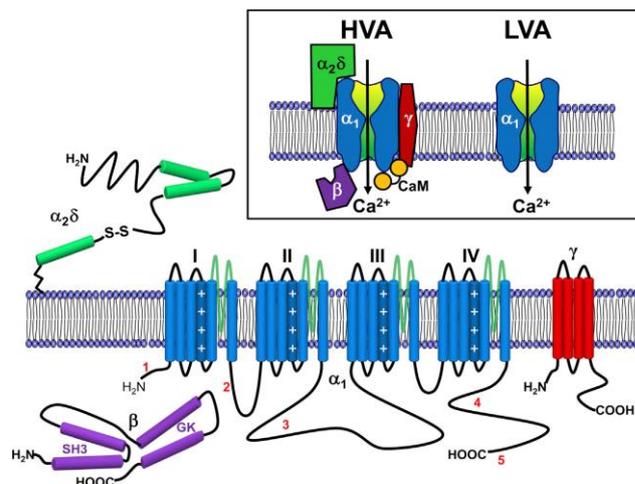


Figura 9. Estructura primaria de los canales de Ca^{2+} . Arriba: los canales HVA son heteromultímeros compuestos por la subunidad $\text{Cav}\alpha_1$, que forma el poro y se co-ensambla con las subunidades accesorias $\text{Cav}\beta$, $\text{Cav}\alpha_2\delta$, y posiblemente $\text{Cav}\gamma$, así como la calmodulina (CaM). Por otra parte, los canales LVA funcionan como monómeros de la subunidad $\text{Cav}\alpha_1$. Abajo: esta subunidad se conforma por cuatro dominios transmembranales (I-IV) conectados por asas citoplásmicas. Cada dominio contiene seis hélices transmembranales, además de un asa reentrante (se muestra en verde). El cuarto segmento transmembranal en cada dominio contiene aminoácidos cargados positivamente y forma el sensor de voltaje (Tomada de Simms y Zamponi, 2014).

Los CCDV se dividen en dos categorías: los canales activados a voltajes más despolarizados (*HVA* o *high voltage activated*: familias Ca_V1 y Ca_V2 ; tipos

L, N, P, Q y R), que permiten el flujo de iones a potenciales partir de los -40 mV para tipo L y -20 mV para tipo N, aproximadamente. El segundo grupo lo conforman los canales que se activan a voltajes menos despolarizados (LVA o *low voltage activated*: Ca_v3 o canales tipo T), que se activan entre -70 y -50 mV, dependiendo del tipo celular. Actualmente la nomenclatura de los canales de Ca²⁺ toma en cuenta la subunidad α1 que los conforma (ver Tabla 1). Es importante mencionar que los canales Ca_v1.3 tipo L se activan alrededor de los -50 mV o menos, se encuentran comúnmente en las dendritas y afectan la generación de PAs (Lipscombe *et al.*, 2004). Todos los canales Ca_v son un blanco de la modulación dopaminérgica, aunque aquí nos enfocaremos a los canales Ca_v1, en lo que se puede considerar un mecanismo mediante el cual la DA regula la excitabilidad de las NEPs (ver Hernández-López *et al.*, 1997, 2000; Pérez-Garci *et al.*, 2003).

Superfamilia	Familia	Subunidad α1	Nombre propuesto	Farmacología
HVA	L	α1C	Ca _v 1.2	Dihidropiridinas (DHP)
		α1D	Ca _v 1.3	
		α1F	Ca _v 1.4	
		α1S	Ca _v 1.1	
	N	α1B	Ca _v 2.2	ω-conotoxina GVIA
	P/Q	α1A	Ca _v 2.1	ω-agatoxina IVA
R	α1E	Ca _v 2.3	SNX482	
LVA	T	α1G	Ca _v 3.1	Mibefradil* ML 218**
		α1H	Ca _v 3.2	
		α1I	Ca _v 3.3	

Tabla 1. Nomenclatura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Modificada de Doering y Zamponi, 2003. * Bezprozvanny y Tsien, 1995. **Xiang *et al.*, 2011).

Existen diversos antagonistas para los integrantes de la superfamilia HVA. Las dihidropiridinas (DHPs) bloquean los canales Ca_v1 pues interactúan con residuos hidrofóbicos de la parte inferior del sitio de unión que se forma

por el cruzamiento entre los S6 de los dominios III y IV de la subunidad $\alpha 1$. Al unirse en la parte externa del poro central y no bloquear por oclusión, se considera que las DHP actúan de manera alostérica (Lipkind y Fozzard, 2003; Catteral *et al.*, 2005). Los antagonistas DHP se unen con mayor afinidad al canal cuando éste sufre la transición al estado inactivado previniendo los cambios conformacionales requeridos para la apertura. La ω -conotoxina GVIA es una toxina aislada del caracol marino *Conus geographus* y bloquea los canales $Ca_v2.2$ de forma específica. Los canales $Ca_v2.1$ son el blanco de las toxinas ω -agatoxina IVA y ω -agatoxina TK provenientes del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. Los canales $Ca_v2.3$ son bloqueados por la toxina SNX482 del veneno de tarántula *Hysteroocrates gigas*, sin embargo no de manera específica (Catteral, 2000). Por último, los canales Ca_v3 son bloqueados por mibefradil (Bezprozvanny y Tsien, 1995), ML 218 (Xiang *et al.*, 2011) y NNC 55-0396 (Huang *et al.*, 2004)

1.3.1 Modulación muscarínica de los canales de Ca^{2+}

Se ha demostrado que los mACh-R tienen como blanco de modulación a los canales de Ca^{2+} (Caulfield, 1993). Son tres los mecanismos principales por los cuales los receptores muscarínicos modulan estos importantes blancos moleculares. Se describirán brevemente.

1.3.1.1 Modulación delimitada a membrana

Los canales de Ca^{2+} son modulados de forma delimitada a la membrana pues no usa segundo mensajero difusible en el citoplasma, es un proceso rápido mediado por proteínas G ($G_{i/o}$) a través de la liberación de la subunidad

$\beta\gamma$, para inhibir o activar los canales (Clapham y Neer, 1997; Nathanson, 2000). Esta modulación se denomina delimitada a membrana dado que no intervienen agentes citosólicos difusibles (Hille, 2001). Se ha observado que esta modulación ocurre comúnmente en canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ y que tiene como propiedades esenciales: i) su sensibilidad a PTX, lo cual involucra proteínas G_i y/o G_o , ii) que la reducción de la corriente se presenta de un modo dependiente de voltaje, con una inhibición más evidente a potenciales más hiperpolarizados (Tedford y Zamponi, 2006). En el neoestriado, en particular en las interneuronas colinérgicas se ha descrito este mecanismo de modulación sobre canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ debido al autorreceptor M_4 (Yan y Surmeier, 1996; Dolezal y Tucek, 1999; Ding *et al.*, 2006). Adicionalmente, existe un trabajo previo que sugiere, más no demuestra, que el receptor M_4 inhibe a los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ a través de la acción directa de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína $G_{i/o}$ en NEPs (Howe y Surmeier, 1995).

1.3.1.2 Modulación mediada por segundos mensajeros

Este mecanismo es más lento pues requiere la generación de segundos mensajeros como consecuencia de la activación de la proteína G. Entre estos encontramos cinasas que activan o inactivan otras proteínas a través de la fosforilación de residuos de serinas y treoninas, y fosfatasas que desfosforilan a las proteínas revirtiendo la acción de las cinasas (Hille, 2001). En el neoestriado se ha descrito previamente dicha modulación mediada por M_1 Rs sobre ambos tipos de NEPs. La modulación muscarínica inhibe las corrientes Ca_v1 , $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ (Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Pérez-Burgos *et al.*, 2008, 2010). La modulación de los canales Ca_v1 y $Ca_v2.2$ se lleva a cabo a través

de la proteína Gq que activa a la PLC, la cual a partir de la hidrólisis de PI(4,5)P₂ activa DAG e IP₃ que libera Ca²⁺ de reservorios intracelulares para activar a la PKC (Pérez-Burgos *et al.*, 2008). Sin embargo, la modulación de los canales Ca_v2.1 se lleva a cabo por hidrólisis de fosfoinosítidos (Pérez-Burgos *et al.*, 2010), el mecanismo se describe más adelante.

En las NEPs, la activación de M₁R_s produce efectos excitadores al reducir el PPH debido a la inhibición de los canales de Ca_v2.1 y Ca_v2.2 que activan a los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K_{Ca}²⁺) encargados de generar el PPH, en estas células. Así, el efecto de los M₁R_s sobre estas corrientes de K⁺ es más bien indirecto (Vilchis *et al.*, 2000; Pérez-Garci *et al.*, 2003; Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Pérez-Burgos *et al.*, 2008, 2010). Por otra parte, los M₁R_s reducen la probabilidad apertura de los canales de K⁺ de tipo Kir 2 aumentando la excitabilidad dendrítica en iNEPs (Shen *et al.*, 2007). Ver Figura 10.

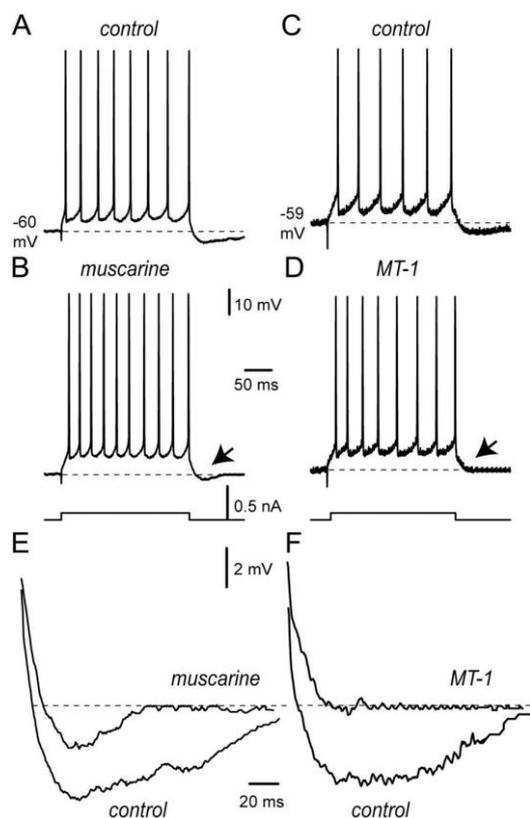


Figura 10. La modulación muscarínica de tipo M₁ sobre el PPH afecta la frecuencia de disparo en las NEPs. A) Tren de PAs provocado con un pulso de corriente intracelular en condiciones control. B) el mismo estímulo promueve una mayor frecuencia de disparo en presencia de muscarina. Note la reducción del PPH luego del tren (flecha). C y D) El agonista muscarínico M₁, MT-1, mimetiza el efecto de la muscarina. E y F) PPHs luego del tren ampliados y superpuestos antes y durante la adición de agonistas muscarínicos (Pérez-Rosello *et al.*, 2005).

1.3.1.3 Modulación mediada por hidrólisis de fosfoinosítidos

Recientemente se ha descrito un mecanismo de modulación de canales iónicos a través de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana con los que interactúan por uniones electrostáticas (Suh y Hille, 2005). Los canales iónicos requieren este vínculo para funcionar adecuadamente, así que al interrumpirse dicha interacción (por hidrólisis de estos lípidos de la membrana), los canales pasan a un estado con menor probabilidad de apertura (Suh y Hille, 2008). La hidrólisis de fosfoinosítidos puede deberse a las fosfolipasas de membrana que merman especialmente PI(4,5)P₂ (Suh y Hille, 2005). La PLC β1 es la lipasa más conocida y es activada por la proteína Gq. Su principal blanco es PI(4,5)P₂. La lipasa corta la cabeza de fosfato polar (IP₃) de los fosfolípidos liberándola en el citoplasma y dejando en la membrana DAG. Ambos productos actúan como segundos mensajeros (PI(4,5)P₂ es un segundo mensajero *per se*) (Eyster, 2007). Por otra parte, existen diversas cinasas que regulan los niveles de fosfoinosítidos membranales: fosfatidilinositol 5-cinasa (PI-5K) que es responsable de la fosforilación de su substrato, el fosfatidilinositol (4) fosfato o PI(4)P para generar PI(4,5)P₂ como producto. La fosfatidilinositol 3-cinasa, o PI-3K, cuyo substrato es fosfatidilinositol y su producto es fosfatidilinositol 3 monofosfato o PI(3)P; finalmente, fosfatidilinositol 4-cinasa, o PI-4K, que fosforila el sitio 4 del anillo de inositol generando PI(4)P, PI(4,5)P₂ o fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PI(3,4,5)P₃), según sea el fosfoinosítido precursor (Eyster, 2007).

En el dStr, los canales Ca_v2.1 de las NEPs son modulados por los M₁Rs a través de la hidrólisis de fosfoinosítidos (Pérez-Burgos *et al.*, 2010).

1.4 Enfermedad de Parkinson

La EP es un desorden neurodegenerativo con signos predominantemente motores: rigidez muscular, temblor en reposo, bradicinecia (problemas para iniciar los movimientos e inhabilidad para ajustar la posición del cuerpo) y falta de equilibrio (Scarr, 2012; Harikrishna Reddy *et al.*, 2014). Esta enfermedad fue descrita por James Parkinson en 1817 en el trabajo titulado “An essay on the shaking palsy” (citado en: Dauer y Przedborski, 2003; Harikrishna Reddy *et al.*, 2014). Los signos motores son el resultado de la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc que proyectan al neostriado (caudado-putamen) y otros núcleos de los GB, ocasionando la disminución del DA estriatal y la acumulación de la proteína α -sinucleína en forma de cuerpos de Lewy (Scarr, 2012; Double, 2012). Además de los signos motores existen manifestaciones no motoras anormalidades emocionales, afectivas y cognitivas (Dauer y Przedborski, 2003).

La etiología de la EP es aún desconocida, sin embargo, la edad es considerada como el factor de riesgo más importante (Harikrishna Reddy *et al.*, 2014). Sin embargo, también se encuentran implicados agentes ambientales y características propias de las neuronas dopaminérgicas. En cuanto a lo último, se han relacionado varios agentes con la degeneración específica de células de la SNc que incluyen la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, toxinas exógenas, la acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, las infecciones virales y la excitotoxicidad (Dauer y Przedborski, 2003).

A nivel mundial, aproximadamente el 1–2% de la población mayor a 65 años sufre de EP (Skibinski y Finkbeiner, 2011). La mayoría de los casos de EP son idiopáticos (90-95%) pues iniciaron por causa inespecífica, y el resto

son formas familiares (5–10%). Se considera que los genes involucrados en la EP familiar son los de α -sinucleína, parkina, DJ-1, PINK-1, LRRK2, UCH-L1, ATP13A2 y HTRA2A (Thomas y Beal, 2007; Hwang, 2013).

Dado que la falta de DA en los GB es la principal causa de los cambios en los circuitos estriatales, los tratamientos actuales para la EP es la administración del precursor dopaminérgico L-DOPA que sigue siendo el tratamiento estándar, mejorando la calidad de vida de los pacientes por un periodo variable (Harikrishna Reddy *et al.*, 2014, Lees *et al.*, 2009). Sin embargo, su uso a largo plazo se asocia con el desarrollo de complicaciones como discinesias tardías (movimientos anormales involuntarios: tics, temblores, contracciones) (Mercuri y Bernardi, 2005) desordenes impulsivos (apuestas y compras compulsivas, hipersexualidad) y conductas anormales repetitivas sin un objetivo aparente (Lees *et al.*, 2009). En la búsqueda de un mejor tratamiento farmacológico se combina el uso de L-DOPA con otros fármacos como agonistas para los D₂Rs y antagonistas colinérgicos (Lees *et al.*, 2009; Pisani *et al.*, 2007); esto último debido al incremento en la concentración de ACh (hipercolinergia) en el neostriado durante la EP (Ince *et al.*, 1997; Wilson, 2004; Ding *et al.*, 2006; Pisani *et al.*, 2007; Aosaki *et al.*, 2010).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó previamente, el adecuado funcionamiento de los GB requiere del balance entre los neurotransmisores DA y ACh, los cuales se encuentran en mayor concentración en el neostriado donde modulan la

excitabilidad de las NEPs actuando sobre canales iónicos, principalmente canales de Ca^{2+} .

Los M_1Rs se encuentran expresados en todas las NEPs y sus acciones sobre corrientes de Ca^{2+} , disparo neuronal y sinapsis han sido estudiadas en roedores control por diversos grupos de investigación (Pérez-Rosello *et al.* 2005; Yan y Surmeier, 1995; Dolezal y Tucek, 1999). Los M_1Rs facilitan ambas vías, *directa e indirecta* (Galarraga *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2007).

Por otra parte, los M_4Rs se expresan preferentemente en las dNEPs y a diferencia de los M_1Rs , el papel de estos receptores ha sido poco explorado. Por lo tanto el estudio de M_4Rs , en particular sus efectos sobre los canales de Ca^{2+} , enriquecerá la comprensión de la contribución colinérgica-muscarínica en la fisiología estriatal. En especial utilizando ligandos muscarínicos específicos e identificando a las neuronas de ambas vías, *directa e indirecta* (utilizando animales transgénicos).

Ahora bien, durante la EP se produce una pérdida de DA en el neostriado y al mismo tiempo, un incremento de la concentración de ACh (hipercolinergia), la cual produce mucha de la sintomatología, de suerte que la administración de drogas anticolinérgicas es uno de los tratamientos de la EP. Pero hasta ahora, los tratamientos no tienen los resultados adecuados pues se administran drogas inespecíficas que no distinguen entre los diferentes mACh-R.

El modelo fisiopatológico actual postula que en la EP la disminución de DA incrementa la actividad de las iNEPs y reprime la actividad de dNEPs conduciendo a una función desbalanceada (Figura 11).

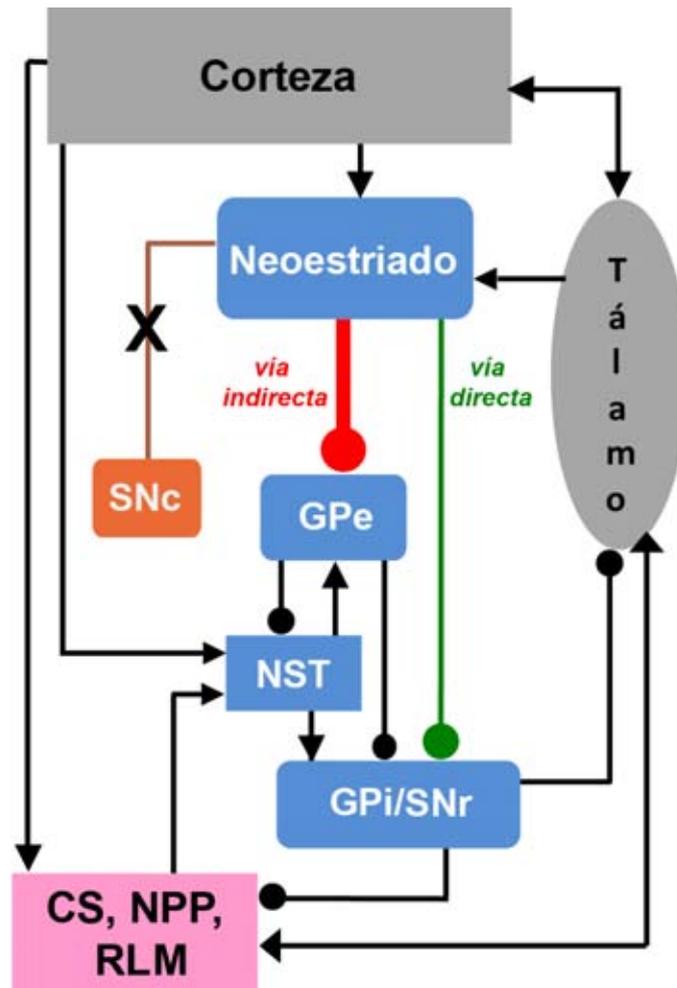


Figura 11. Circuitos cortico-estriales durante la Enfermedad de Parkinson. Durante la EP, la depleción de DA estriatal causada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc) conduce a la hiperactividad de las neuronas de la *vía indirecta* (línea roja) ocasionando rigidez y falta de movimiento. En cambio, las neuronas la *vía directa* presentan hipoactividad lo cual resulta en represión del movimiento (línea verde; note el grosor de las líneas) (Obeso *et al.*, 2004; Aosaki *et al.*, 2010). Produciendo el desbalance funcional de ambas vías. Abreviaturas: núcleo subtalámico (NST), globo pálido interno (GPi); sustancia nigra reticulata (SNr), colículo superior (CS), núcleo pedúnculo pontino (NPP), región locomotora mesencefálica (RLM). Flechas = excitación. Círculos = inhibición.

Por todo lo anterior, nuestro trabajo de investigación fue iniciado con las siguientes preguntas:

- ✓ ¿La activación de los receptores M_4 expresados en las neuronas estriales de la *vía directa* (dNEPs) modulará los canales de Ca^{2+} ?
- ✓ Si se regulan ¿qué tipo de canales son?

- ✓ ¿Es la regulación consistente en un aumento de la corriente o en una disminución de la misma?
- ✓ ¿Cómo se afecta la excitabilidad de la *vía directa* tras la activación de los receptores M₄?
- ✓ ¿Existe alguna interacción entre los receptores M₄ y D₁ ya que se expresan en el mismo tipo celular?
- ✓ ¿Cómo recuperar la actividad de las neuronas de la *vía directa* durante la EP?

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

- La activación del receptor muscarínico M₄ modula la entrada de Ca²⁺ por alguno de los canales de calcio activados por voltaje (Ca_v1, Ca_v2.1, Ca_v2.2 o Ca_v2.3) presentes en las neuronas estriatales de proyección.
- La modulación muscarínica por M₄ se observa preferentemente en neuronas de la *vía directa*.
- Los receptores M₄ interactúan con los receptores D₁ regulando la excitabilidad de las neuronas de la *vía directa*.
- Si el objetivo de la terapéutica es activar a la *vía directa* e inhibir a la *indirecta*, las drogas colinérgicas podrían hacer esto.

3.2 Objetivo general

Determinar los efectos de la activación de los receptores muscarínicos de tipo M₄ sobre los canales de Ca²⁺ activados por voltaje en neuronas de proyección del neostriado en animales control y observar las repercusiones en la excitabilidad de estas células.

3.3 Objetivos particulares

- Evaluar mediante fijación de voltaje en célula entera el efecto de los receptores M₄ sobre la corriente de Ca²⁺ en las NEPs de animales control.
- Comprobar si la activación de los receptores M₄ se observa preferentemente en neuronas de la *vía directa*.
- Determinar cuáles son los canales de Ca²⁺ regulados por los receptores M₄.
- Definir si la modulación muscarínica M₄ de estos canales es delimitada a membrana y dependiente de voltaje o si utiliza señalización citoplásmica.
- Evaluar la interacción de los receptores M₄ con los receptores D₁ en neuronas de la *vía directa*.

4. MÉTODOS

Los protocolos utilizados se realizaron conforme a las guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que incluye minimizar el número de animales utilizados hasta alcanzar significancia estadística y evitar el sufrimiento.

4.1 Obtención de rebanadas de cerebro y neuronas disociadas

Se utilizaron ratones transgénicos BAC-D₁-eGFP o BAC-D₂-eGFP de 60 a 90 días postnatales y ratas macho de la cepa Wistar (100-120 g) del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales fueron anestesiados profundamente con una mezcla de ketamina (85 mg/kg ip) y xilazina (15 mg/kg ip), luego se decapitaron y sus cerebros fueron rápidamente extraídos y colocados en una solución a 4°C cuya composición fue (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 glucosa, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico (pH 7.4 ajustado con HCl, 300±5 mOsm/l, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂). Con ayuda de un vibratomo (Pelco 102, Ted Pella, INC), se obtuvieron rebanadas sagitales de 300 µm de espesor que fueron mantenidas de 1-6 h en la misma solución salina a temperatura ambiente (Bargas *et al.*, 1994; Pérez-Burgos *et al.*, 2008; Prieto *et al.*, 2011; Hernández-González *et al.* 2014).

A partir de las rebanadas, se disecó el estriado dorsal, y fue incubado en solución salina (con 10 mM de HEPES) y enzimas proteolíticas (1 mg/mL de Pronasa E tipo XIV durante 15-20 minutos a 34°C). Después del periodo de digestión, el tejido fue transferido a una solución baja en Ca²⁺ (0.4 mM) para disociar mecánicamente a las neuronas con pipetas Pasteur pulidas con calor a grosores descendentes. El sobrenadante obtenido fue colocado (1 mL) en cajas

de cultivo de 35-mm Lux Petri montadas en la platina de un microscopio invertido. Las células se adhieren espontáneamente al fondo del plato (10-15 minutos). Luego se perfundieron con 1 mL de la solución de registro que contenía (en mM): 0.001 tetrodotoxina (TTX), 140 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.4 ajustado con NaOH, 300±5 mOsm/l). Esta misma solución fue usada para perfundir a las células durante el registro mediante el control de miniválvulas automáticas (Lee, Essex, CT, EUA). Las neuronas eGFP-positivas fueron visualizadas usando una lámpara UV (X-Cite; EXFO, Ontario, Canadá).

4.2 Registros en fijación de voltaje

Las corrientes de Ca²⁺ fueron obtenidas por medio de registros de fijación de voltaje en célula entera en NEPs de tamaño medio (10-12 μm de diámetro y 5-10 pF de capacitancia, ver Yan y Surmeier, 1996) con unos cuantos troncos dendríticos cortos; el potencial de membrana se mantuvo en -80 mV. Se usaron pipetas de vidrio de borosilicato (WPI; Sarasota, FL) estiradas y pulidas con ayuda de un estirador de pipetas (Sutter Instruments, Novato, CA) y una microforja respectivamente (Nikon, Melville, NY, EUA). La composición de la solución interna fue (en mM): 180 *N*-methyl-D-glucamina (NMDG), 40 HEPES, 10 EGTA, 4 MgCl₂, 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina (pH 7.2 ajustado con H₂SO₄, 280±5 mOsm/l). Los registros de célula entera fueron realizados con técnicas estándar: la resistencia de los electrodos fue de 3-6 MΩ en el baño y el potencial de unión fue corregido (5-10 mV aproximadamente.). Los registros fueron obtenidos con ayuda de un amplificador (Axopatch 200B; Axon Instruments, Foster City, CA, EUA) controlados y monitoreados con el programa pClamp

versión 8.2 (Axon Instruments). Después de la ruptura del sello, la resistencia en serie ($\leq 10 \text{ M}\Omega$) fue compensada en un 70-80% y monitoreada periódicamente. Los registros fueron almacenados en una computadora a través de una tarjeta de adquisición de datos para su posterior análisis (Axon Instruments).

La relación corriente-voltaje (curva I-V) obtenida con registros de corriente pasando por los canales de Ca^{2+} (utilizando Ba^{2+} como acarreador de carga; Fig.12) se tomó antes y después de la aplicación de los distintos fármacos. Estas curvas fueron construidas utilizando comandos rectangulares de voltaje (20 ms) de -80 a +50 mV en pasos de 10 mV (Fig. 12A) y con comandos de voltaje en forma de rampa (200 ms; 0.7 mV/ms) de -80 a +50 mV (Fig. 12B). Las curvas I-V obtenidas con ambos métodos coinciden y se superponen señalando que el control temporal y espacial de voltaje es adecuado (Fig. 12C; Bargas *et al.*, 1994; Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Pérez-Burgos *et al.*, 2008, 2009; Prieto *et al.*, 2009, 2011; Hernández-González *et al.* 2014). Por razones de claridad en las figuras y para su mejor entendimiento, la mayor parte de estas muestran trazos representativos obtenidos con comandos en forma de rampa. Cabe mencionar que se utilizó Ba^{2+} como acarreador de carga ya que no es un buen sustituto de Ca^{2+} en la activación de enzimas intracelulares asociadas con “rundown” o inactivación de la corriente, también incrementa la amplitud de la corriente aún en células pequeñas como las NEPs evitando así usar acarreador de carga (Ca^{2+}) en alta concentración para conseguir mayor resolución y además es un potente bloqueador de canales de K^+ . Los canales de Na^+ fueron bloqueados con 1 μM de TTX. Adicionalmente, el K^+ intracelular fue reemplazado con NMDG. Las corrientes aisladas fueron bloqueadas con 200-400 μM de Cd^{2+} (ver Bargas *et al.*, 1994).

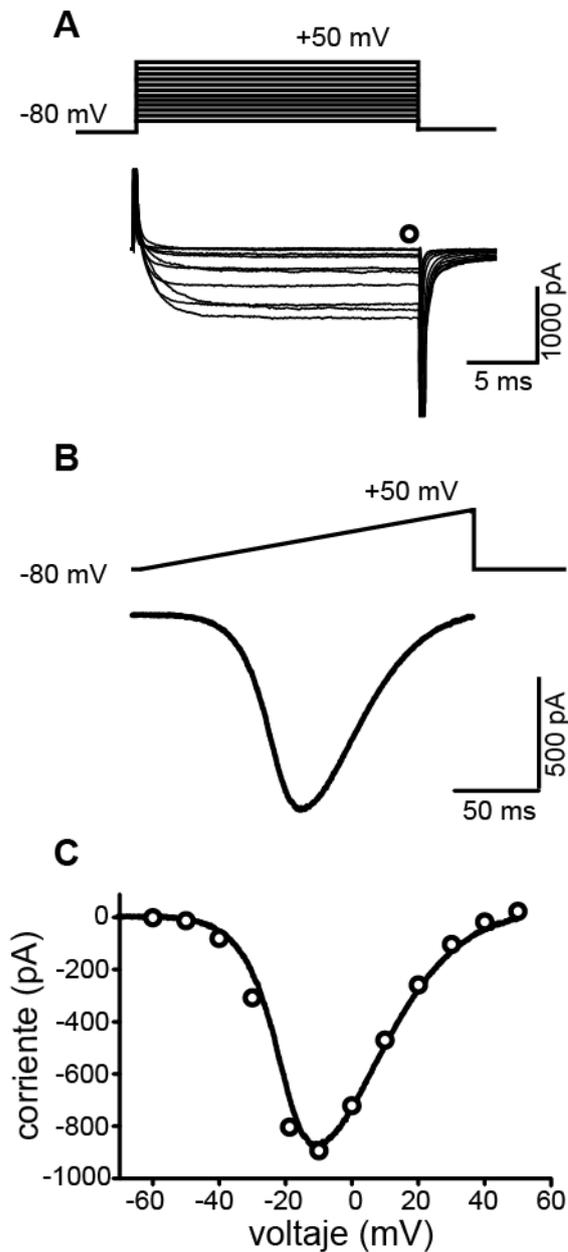


Figura 12. Corriente macroscópica de Ca^{2+} en neuronas neostriatales disociadas agudamente. A) Corrientes entrantes evocadas por comandos de voltaje despolarizantes desde -80 a +50 mV en pasos de 10 mV (las colas de corriente fueron cortadas). B) Corriente entrante provocada en la misma neurona por un comando de rampa (0.7 mV/ms). C) Relación corriente-voltaje (gráfica I-V) construida a partir de ambos protocolos superpuestos (círculos: comandos en pasos; línea continua: comando en forma de rampa). La gráfica I-V hecha a partir del protocolo de rampa parece una función ajustada a la I-V obtenida con el protocolo de pasos.

4.3 Registros en fijación de corriente

Como se mencionó previamente, se utilizaron ratones transgénicos BAC D₁ o D₂ eGFP (25-30 días postnatales) para obtener rebanadas cerebrales las cuales fueron sumergidas en solución salina fría que contenía en (mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄ y 15 glucosa (pH

7.4, 300 ± 5 mOsm/l, saturada con 95% O_2 y 5% CO_2). Las rebanadas se incubaron en solución salina a temperatura ambiente por ≥ 1 h.

Luego de la incubación, las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro y se perfundieron continuamente con solución salina oxigenada (4–5 ml/min). Los registros en fijación de corriente fueron realizados con la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula entera en las NEPs. Las rebanadas se registraron usando microscopia de iluminación infrarroja. La adquisición de datos se realizó con un software diseñado en el ambiente LabVIEW (National Instruments, Austin TX).

Las pipetas de registro (3–6 M Ω) fueron llenadas con solución interna (en mM): 115 KH_2PO_4 , 2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 ATP, 0.2 GTP, 5% biocitina (pH = 7.2; 285 ± 5 mOsm/l). Las neuronas de proyección fueron identificadas por sus propiedades electrofisiológicas y su fluorescencia. Además, se llenaron con biocitina para ser posteriormente identificadas con técnicas inmunohistoquímicas.

Para evocar y registrar respuestas cortico-estriatales supraumbrales se estimuló la corteza sensoriomotora con electrodos bipolares concéntricos (50 μm en la punta, FHC, Bowdoinham, ME). La distancia entre el electrodo de registro y el de estimulación fue de 1 mm. Las respuestas sinápticas ortodrómicas fueron provocadas por una serie de pulsos de corriente de intensidad creciente hasta lograr las respuestas supraumbrales, con y sin disparo repetitivo de potenciales de acción. Los estímulos fueron producidos por el programa y controlados por una unidad de aislamiento (Digitimer Ltd, Inglaterra). El potencial de membrana se mantuvo a -80 mV, (cerca del “*down*”-state o potencial de membrana en reposo; -81 ± 5 mV) mientras las respuestas cortico-estriatales postsinápticas

con duración de varios cientos de milisegundos eran inducidas (Flores-Barrera *et al.*, 2010; 2011; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Los trazos mostrados son la media de tres registros tomados posterior a la estabilización de la amplitud.

4.4 Imagenología de calcio.

Se usaron ratones BAC D₁ (16-21 días postnatales) que fueron sometidos a perfusión transcardíaca con una solución fría (en mM): 234 de sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 0.4 CaCl₂, 28 NaHCO₃, 1.44 NaH₂PO₄, 7 glucosa, 0.28 ácido ascórbico y 4.5 piruvato (pH = 7.4 con NaOH, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂) antes de la decapitación. Las rebanadas se obtuvieron con el mismo procedimiento. La perfusión transcardiaca permite la remoción de eritrocitos y preservación osmótica del tejido cerebral.

Posteriormente, las rebanadas se incubaron a 34 °C en la oscuridad durante 40 minutos con 6.5 µM del fluoróforo *calcium orange AM* (Invitrogen, C3015) y se equilibraron con 95% O₂ y 5% CO₂. Se utilizó *calcium orange* para evitar contaminación de la señal fluorescente ya que el pico de su longitud de onda de emisión (572 nm) no se superpone con el pico de emisión de eGFP (508 nm).

Las rebanadas fueron perfundidas con solución salina control en una cámara fabricada en el laboratorio y ajustada en un microscopio vertical equipado con un objetivo 20X para inmersión en agua (Olympus XLUMPlanFI; Olympus America Inc.). La excitación fue con luz a 565 nm utilizando un iluminador Lambda LS (Sutter Instruments, Novato, CA). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-22 °C).

Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital (CoolSNAP K4, Photometrics; Roper Scientific, Tucson, AZ) a 100-250 ms / cuadro. El software de imagenología también fue diseñado en el laboratorio usando el entorno de LabVIEW. El campo de imagen fue de 800 X 800 μm . Se tomaron películas cortas (180 s) y 20 ms de exposición / imagen; en las diferentes condiciones farmacológicas (10-15 min entre grabación de video para permitir la difusión del fármaco). Con el mismo programa se llevó a cabo el procesamiento inicial de las series de imágenes.

Todas las neuronas activas en un campo fueron identificadas de forma automática y su promedio de fluorescencia se midió en función del tiempo. El ruido de fondo se descartó usando un filtro de promediación de 5 píxeles. Las señales de fluorescencia dependiente de calcio se calculan como: $(F_i - F_o) / F_o$, donde F_i es la intensidad de la fluorescencia en cualquier cuadro de la película y F_o representa la fluorescencia basal. Las señales de calcio provocadas por los potenciales de acción fueron detectadas con base en un valor umbral dado por el criterio de la primera derivada de la señal fluorescente. Esto es, sólo se tomaron en cuenta señales de calcio cuya primera derivada temporal fuera mayor que 2.5 veces la desviación estándar de la señal basal (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

4.5 Fármacos y materiales

Para las células dissociadas los fármacos fueron aplicados mediante un sistema alimentado por la fuerza de gravedad con un tubo capilar posicionado a unos 100 μm de la célula registrada en el sentido del flujo de perfusión de modo que las soluciones fluyeran en su dirección. Los cambios de solución fueron

realizados con un sistema de microválvulas controlados con D.C. (Lee; Essex, CT, EUA). Este método permite la aplicación reversible de fármacos (ver Pérez-Rosello *et al.*, 2005). Para los registros en fijación de corriente e imagenología de calcio, los fármacos fueron administrados en la solución salina del baño de perfusión a partir de soluciones madre. La TTX fue obtenida de Alomone Laboratories (Jerusalén, Israel). Las toxinas muscarínicas de mamba verde (MT-3 y MT-7) fueron obtenidas de Peptides International (Louisville, KY, EUA). Nicardipina, muscarina y SKF-81297 de Sigma-Aldrich-RBI (St. Louis, MO, EUA). Los fármacos fueron disueltos en agua para preparar soluciones madre y agregados en la solución de perfusión para tener la concentración final. La nicardipina fue preparada en HCl (1%), en cuyo caso, la solución salina control contuvo la misma concentración final del ácido. Las soluciones madre nunca fueron usadas por más de una semana.

4.6 Análisis de los datos

Los datos digitalizados fueron analizados y graficados con un programa de cómputo comercial (Origin 7; Microcal, Northampton, MA). Media, mediana y error estándar de la media (E.E.M.) de la modulación de la corriente acarreada por Ba^{2+} por los canales de Ca^{2+} (reportada aquí como corriente de Ca^{2+}) medida al pico son reportadas. La prueba *t* de Student pareada o no pareada, y ANOVA de una o dos vías con prueba *post hoc* Bonferroni fueron utilizadas para comparar mediciones repetidas. Para muestras pequeñas se utilizó estadística libre de distribución tal como las pruebas ANOVA de Friedman o de Kruskal-Wallis con pruebas *post hoc* de Dunnette o bien la U de Wilcoxon o la

T de Mann Whitney (dependiendo de si fueron las muestras eran apareados o no). Utilizamos un nivel de significancia de $P < 0.05$.

También utilizamos los programas comerciales Graphpad Prisma 5 y Systat 11 para realizar o corroborar las diversas pruebas estadísticas.

5. RESULTADOS

5.1 La activación de los receptores muscarínicos M_4 incrementa la corriente de Ca^{2+} en neuronas disociadas estriatales de la *vía directa*.

Las NEPs expresan receptores muscarínicos de los tipos M_1 y M_4 . Las acciones de los M_1 Rs ya han sido previamente reportadas ampliamente por el nuestro y otros laboratorios (Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2007); demostrando que incrementan la excitabilidad de ambos tipos de NEPs al disminuir las corrientes salientes directa o indirectamente, atenuando las corrientes de Ca^{2+} que las activan (Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Vilchis *et al.*, 2000).

Así, en este proyecto doctoral se estudió la modulación o regulación muscarínica (muscarina $1\mu M$, Pérez-Rosello *et al.*, 2005) mediada por los M_4 Rs sobre la corriente total de Ca^{2+} . Los resultados del proyecto fueron publicados en la revista *Neuropharmacology*. Una copia del reimpresso de este documento ha sido añadida en el **Anexo I**.

A partir de los ratones transgénicos BAC- D_1 -eGFP se obtuvieron neuronas estriatales de la *vía directa* (dNEPs). Adicionalmente, para aislar el efecto de los M_4 Rs se empleó un antagonista de los M_1 Rs altamente selectivo que forma una interacción fuerte y estable: la toxina muscarínica MT-7 a una concentración saturante (50 nM; Bradley, 2000; Karlsson *et al.*, 2000;

Jerusalinsky *et al.*, 2000; ver Fruchart-Gaillard *et al.* 2006, la K_i es de 14 pM). Este diseño experimental permitió tener sólo a los M_4 Rs como los únicos receptores disponibles para la activación por el agonista muscarina en las dNEPs, ya que estos receptores se expresan preferentemente en dicha vía (Santiago y Potter., 2001 y Yan *et al.*, 2001). En la parte izquierda de la figura 13A se muestra el curso temporal de la amplitud de la corriente macroscópica de Ca^{2+} obtenido de un registro en una dNEP de ratón BAC D_1 -eGFP antes, durante y después de la adición de muscarina 1 μ M en presencia continua de MT-7 (con los M_1 Rs bloqueados). Se observó que la muscarina incrementó la corriente de Ca^{2+} y que este efecto es reversible. A la derecha del curso temporal (Fig. 13A) se muestran gráficas I-V representativas durante los momentos indicados con números en el curso temporal. La figura 13B ilustra histogramas resumiendo los resultados en una muestra de experimentos similares en dNEPs, donde la activación de los M_4 Rs por muscarina produjo un incremento en la corriente de Ca^{2+} de $51 \pm 9\%$, (mediana 32%, $n = 20$; *** $P = 0.0001$; prueba t de Student pareada).

Del mismo modo, se realizaron estos experimentos en un grupo de iNEPs obtenidas de ratones BAC D_2 -eGFP también en presencia de MT-7. El curso temporal y la curva I-V obtenidos de una célula representativa se ilustran en la figura 13B. Como se puede notar, la muscarina no produjo un efecto significativo en las iNEPs (porcentaje de modulación $7 \pm 3\%$, mediana 5%, $n = 8$, NS, Prueba t de Student pareada; figura 13D). Estos experimentos confirmaron que los receptores M_4 R se expresan preferentemente en las dNEPs (Yan *et al.*, 2001).

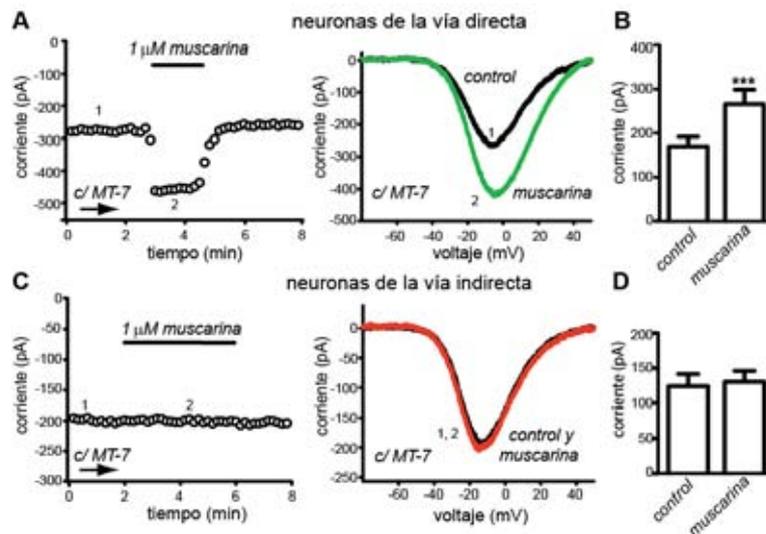


Figura 13. El agonista muscarina modula la corriente de Ca^{2+} en las neuronas estriales de proyección de la vía directa a pesar de que los receptores M_1 se encuentran bloqueados. A) 50 nM de MT-7 fueron adicionados para bloquear los receptores M_1 y asegurar que los efectos muscarínicos se deben únicamente a la activación de los receptores M_4 : el curso temporal de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} mostrando que la adición de muscarina incrementa la corriente en neuronas estriales de la vía directa (dNEPs) de ratones BAC D_1 -eGFP. El panel derecho muestra la gráfica I-V obtenida en diferentes momentos durante el experimento como se indica con los números en el curso temporal. B) La amplitud de la corriente de Ca^{2+} aumentó de manera significativa (aplicación de muscarina en color verde) en todas las dNEPs registradas. C) El curso temporal de un experimento similar en neuronas estriales de la vía indirecta (iNEPs) de ratones BAC D_2 -eGFP muestra que la muscarina (trazo color rojo) no modula la corriente de Ca^{2+} cuando los receptores M_1 están bloqueados con MT-7. Las gráficas I-V indican con números los momentos del curso temporal de donde fueron tomadas. D) No se observaron efectos significativos de la muscarina sobre las iNEPs en estas condiciones.

Adicionalmente, estos experimentos fueron realizados en NEPs de rata donde se observaron resultados concordantes (datos no mostrados). Es decir, en la mitad de las células, la muscarina produjo un incremento de la corriente ($38 \pm 9\%$, mediana 32% ; $n = 8$; $**P = 0.032$, Prueba t de Student pareada) y en la otra mitad el efecto no fue significativo ($1.5 \pm 0.3\%$, mediana 1% , $n = 9$; NS, Prueba t de Student pareada), sugiriendo que este resultado es reproducible en diferentes especies.

Para corroborar que el aumento de la corriente de Ca^{2+} en presencia de MT-7 en las dNEPs se debe a la activación de los M_4Rs , se aplicó muscarina en presencia de 20 nM de la toxina muscarínica MT-3 (antagonista potente y selectivo de estos receptores, la K_i es 1.3 nM; Bradley, 2000; Jerusalinsky *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2000; Purkerson y Potter, 1998). Como se muestra en el curso temporal y se indica con los números en las curvas I-V de la figura

14A, las acciones de la muscarina (trazo verde) fueron prevenidas por MT-3. Los histogramas (Fig. 14B) denotan la ausencia de cambios significativos por acción muscarínica en dNEPs cuando ambas toxinas MT-3 y MT-7 se encuentran presentes; apuntando a que el incremento de la corriente de Ca^{2+} en dNEPs ocurre por la activación de los M_4Rs y que los receptores M_1 y M_4 son los únicos receptores muscarínicos presentes en las dNEPs (Fig.14B; $n = 9$, $5 \pm 1\%$, mediana 4%; NS, Prueba t de Student pareada).

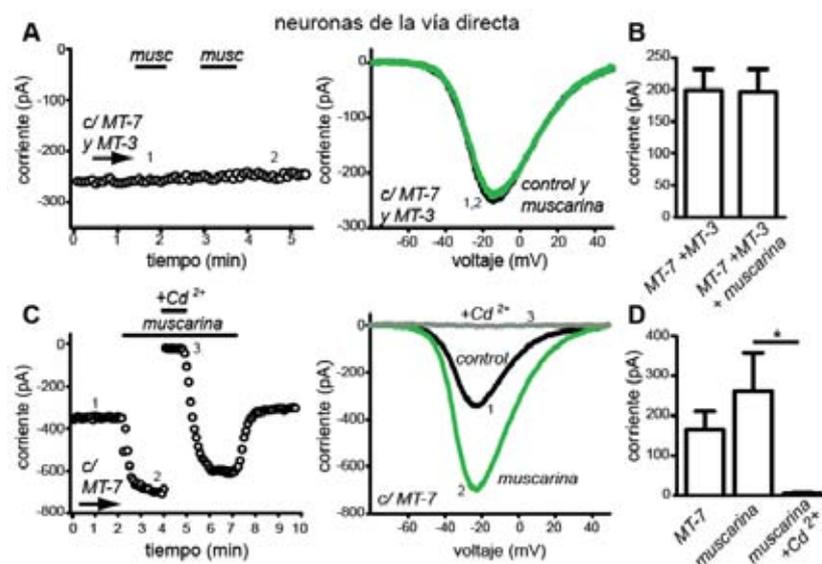


Figura 14. Los receptores M_4 modulan selectivamente a la corriente de Ca^{2+} en las dNEPs. A) Curso temporal de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} en una dNEP mostrando que la muscarina no tiene efecto en presencia de 50 nM de MT-7 y 20 nM de MT-3, es decir, cuando los receptores M_1 y M_4 están bloqueados con estos antagonistas específicos. Panel derecho: la curva I-V representativa obtenida en diferentes momentos durante el experimento como se indica por los números en el curso temporal (muscarina en color verde). B) La muscarina no tiene efecto significativo en las dNEPs cuando ambos tipos de receptor están bloqueados, sugiriendo que el incremento muscarínico de la corriente de Ca^{2+} es específico de los receptores M_4 (de hecho, los receptores M_1 disminuyen la corriente de Ca^{2+} ; Pérez-Rosello et al., 2005). C) Curso temporal ilustrando que la corriente potenciada por 1 μM de muscarina en dNEPs, en presencia de MT-7, es completa y reversiblemente bloqueada por 400 μM de Cd^{2+} , sugiriendo que toda la corriente registrada fluye a través de canales de Ca^{2+} . En el panel derecho la curva I-V representativa indica con números los momentos del curso temporal en los que fueron adquiridas. D) Los histogramas corresponden a las muestras de este experimento mostrando que la corriente aumentada por muscarina es acarreada por canales de Ca^{2+} .

Hay varios tipos de canal de Ca^{2+} en las NEPs: $\text{Ca}_v1.2,3$ y $\text{Ca}_v2.1-3$ (Bargas et al., 1994, Salgado et al., 2005; Martella et al., 2008), los cuales pueden ser bloqueados con concentraciones micromolares de Cd^{2+} (200-400

μM , ver Bargas *et al.*, 1994). En la figura 14C se corroboró que la corriente potenciada por la activación de los M_4Rs en las dNEPs es la corriente de Ca^{2+} . Note el bloqueo completo de la corriente en presencia de MT-7, tanto en el curso temporal como en las curvas I-V. El bloqueo por Cd^{2+} fue reversible. La figura 14D muestra el histograma que resume los datos muestrales ($n = 26$; ANOVA con prueba *post-hoc* Bonferroni: $F_{2,57}=10.75$, $***P = 0.0001$; control vs. muscarina: $**P = 0.021$; muscarina vs. Cd^{2+} : $***P < 0.0001$).

Debido a los efectos de MT-3 y Cd^{2+} , concluimos que cuando los M_1Rs no se encuentran disponibles por el bloqueo de MT-7, la muscarina actúa a través de los M_4Rs para incrementar la corriente de Ca^{2+} en las dNEPs. Estos efectos no se pudieron observar en iNEPs. Sin embargo, como se mencionó antes, los M_1Rs *disminuyen* no *aumentan* la corriente de Ca^{2+} en las NEPs de ambas vías (Pérez-Rosello *et al.*, 2005), indicando que los efectos muscarínicos potenciadores sean mediados por los M_4Rs .

5.2 La activación de los receptores muscarínicos M_4 incrementa la corriente de Ca^{2+} a través de canales Ca_v1 .

Para comenzar a dilucidar el mecanismo de acción de los M_4Rs , se cuestionó cual componente de la corriente de Ca^{2+} estaría siendo modulado (Bargas *et al.*, 1994). Primero se usó nicardipina ($5 \mu\text{M}$) para determinar la participación de los canales Ca_v1 . En la figura 15A se ejemplifica el curso temporal del efecto de esta dihidropiridina sobre la amplitud de la corriente de Ca^{2+} en presencia de MT-7: se bloqueó parte de la corriente de Ca^{2+} (Salgado *et al.*, 2005).

De manera interesante, cuando los canales Ca_v1 se encontraban bloqueados con la nicardipina, la activación de los M_4Rs no produjo cambios significativos en dNEPs (Fig. 15A). Las curvas I-V representativas se ilustran en la figura 15B (muscarina en color verde). Estos mismos resultados fueron encontrados en una muestra de dNEPs tal como lo indican los histogramas en la figura 15C ($3 \pm 1\%$, mediana = 2, $n = 6$, NS, Prueba t de Student pareada).

Se sabe que los canales de Ca^{2+} son modulados por GPCRs a través de varios mecanismos (ver arriba): uno que depende del voltaje (sensible a la despolarización) es delimitado a membrana e involucra la unión de las subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G a regiones citoplásmicas del canal (Tedford y Zamponi, 2006); otro mediado por segundos mensajeros que pueden difundir por el citosol y que es independiente del voltaje (Hille, 2001) y aun otro mediado por la hidrólisis de fosfoinosítidos (Suh y Hille, 2005).

Debido a que los M_4Rs actúan modulando los canales Ca_v1 , se consideró que el mecanismo no es delimitado a membrana (Ding *et al.*, 2006; Dolezal y Tucek, 1999; Tedford y Zamponi, 2006; Vivas *et al.*, 2012; Yan y Surmeier, 1996). Aún así, se decidió examinar este mecanismo. Se emplearon neuronas disociadas de ratones BAC D_1 -eGFP para observar la modulación muscarínica con un protocolo de doble pulso que consiste en aplicar dos pulsos de magnitud idéntica (Pulso 1 y 2 a 0 mV), separados por un pulso despolarizante llamado pulso condicionante a +80 mV (Fig. 15D-F). Este pulso provoca la remoción de modulación por proteínas G de los canales. Entonces, si se trata de una regulación dependiente de voltaje, la comparación de la amplitud de la corriente modulada entre el pulso 1 y el 2, la amplitud durante el segundo pulso se vería alterada en comparación a la observada en el primer pulso. Al

cociente entre la corriente en el pulso 2 y la corriente en el pulso 1 se le denomina índice de facilitación. Como se puede apreciar, después de remover la modulación constitutiva por proteínas G, el cambio en la magnitud absoluta de la corriente después de la adición de muscarina ($1 \mu\text{M}$, trazo color verde) no fue significativamente diferente (Figs. 15E, F; $n = 6$; NS, Prueba t de Student pareada). Este resultado sugiere que la modulación de los $M_4\text{Rs}$ sobre los canales Ca_v1 no es delimitada a membrana o dependiente de voltaje.

La cascada de señalización utilizada por estos receptores para aumentar la corriente a través de los canales Ca_v1 requiere de mayor estudio.

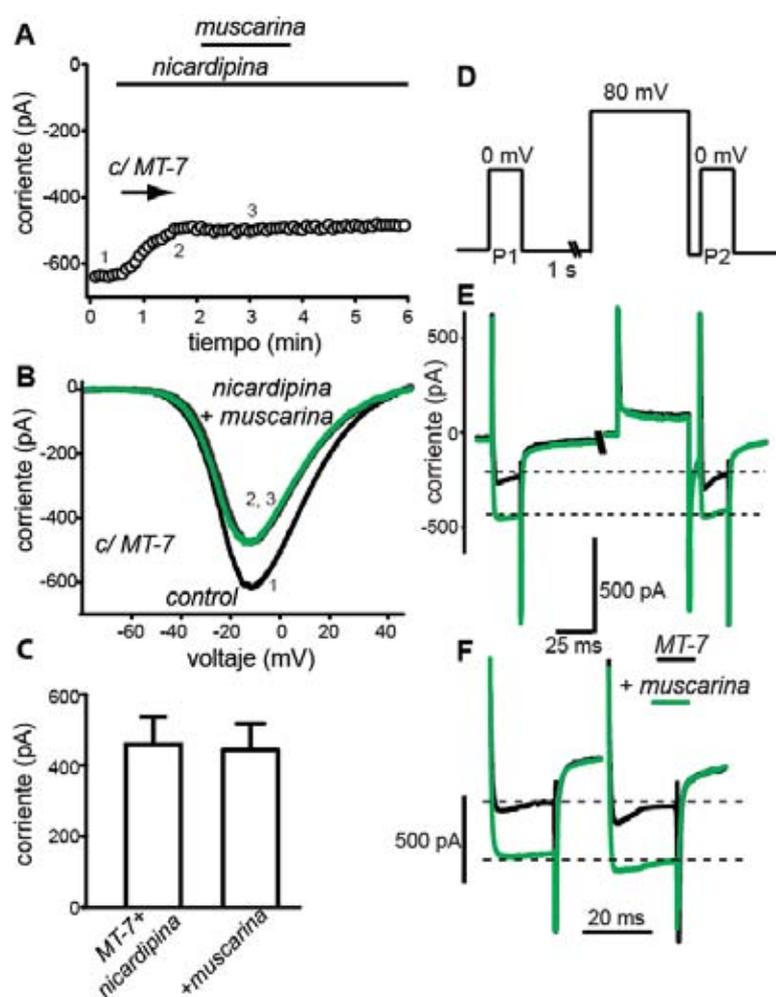


Figura 15. La corriente de Ca^{2+} potenciada por los receptores M_4 es mediada por canales Ca_v1 (L). A) Curso temporal ilustrando, primero, que la corriente de Ca^{2+} en las dNEPs se reduce con nicardipina ($5 \mu\text{M}$) un antagonista de los canales Ca_v1 (las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de las drogas). Segundo, que una vez bloqueados los canales Ca_v1 la acción de la muscarina ($1 \mu\text{M}$) sobre la corriente de Ca^{2+} de las dNEPs fue ocluida. B) Curvas I-V obtenidas en diferentes momentos durante el experimento como se indica con los números en el curso temporal. La MT-7 estuvo presente durante todo el experimento. C) La muscarina no tuvo efectos significativos sobre la corriente de Ca^{2+} una vez que los receptores M_1 y los canales Ca_v1 estaban bloqueados en las dNEPs. D) Protocolo de doble pulso ("pre-pulse facilitation/relief protocol") utilizado para poner a prueba la dependencia de voltaje de la modulación mediada por receptores M_4 . E) La corriente de Ca^{2+} provocada por el protocolo en (D) antes (trazo negro) y después de aplicar muscarina (trazo verde). Note que el pulso condicionante a $+80 \text{ mV}$ cambió la cinética y la amplitud de la corriente de Ca^{2+} sugiriendo una acción constitutiva de las proteínas G. Sin embargo, la modulación muscarínica fue la misma antes y después de la despolarización condicionante a $+80 \text{ mV}$. Lo que sugiere que el efecto mediado por los receptores M_4 no es delimitado a membrana, acorde con la modulación de los canales Ca_v1 . F) Amplificación de los trazos en (E) antes y después del pulso condicionante.

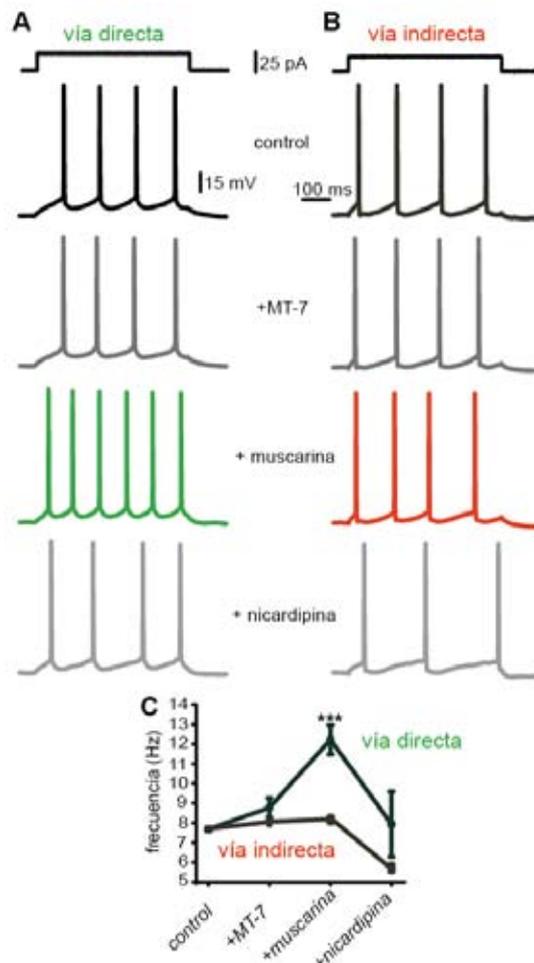
5.3 El incremento en la corriente de Ca^{2+} llevada por los canales Ca_v1 induce un aumento de la excitabilidad en las neuronas de la *vía directa* debida a los receptores M_4 .

Se ha reportado que un aumento de la corriente de Ca^{2+} acarreada a través de los canales tipo Ca_v1 facilita las despolarizaciones provocadas por estímulos incrementando el disparo de PAs en las NEPs (Hernández-López *et al.*, 1997; Pérez-Garci *et al.*, 2003). Esta actividad se observa de manera preferencial a potenciales de membrana despolarizados (p. ej., -60 mV , más cerca del estado activo o "*up-state*") donde la participación de algunas corrientes de K^+ está atenuada por la inactivación (Galarraga *et al.*, 1997; Hernández-López *et al.*, 1997; Nisenbaum *et al.*, 1996; Pérez-Garci *et al.*, 2003). Para averiguar si el aumento en la corriente llevada por los canales Ca_v1 e inducida por los M_4Rs produce una despolarización suficiente para incrementar la excitabilidad, se realizaron experimentos en configuración de célula entera en fijación de corriente. Los experimentos se hicieron en dNEPs e iNEPs utilizando rebanadas de cerebro de ratones BAC $\text{D}_1\text{-eGFP}$ y BAC $\text{D}_2\text{-eGFP}$, respetivamente. En la figura 16 se ejemplifican estos experimentos: de arriba a abajo en las figuras 16A y B se

muestran las respuestas a pasos de corriente intracelular despolarizante (arriba) desde un potencial de mantenimiento de -60 mV. Los controles fueron diseñados para evocar el mismo número de PAs en las dNEPs y las iNEPs (Figs. 16A, B control en negro). En estas condiciones, la adición de MT-7 para bloquear a los M_1 Rs no produjo ninguna consecuencia significativa (Figs. 16A, B +MT-7 en gris; NS), sugiriendo la ausencia de una actividad constitutiva por parte de estos receptores, al menos bajo estas condiciones. Cuando los M_4 Rs fueron los únicos receptores muscarínicos disponibles en las NEPs, la adición de muscarina ($1 \mu\text{M}$) aumentó el número de PAs en las dNEPs pero no en las iNEPs (Figs. 16A, B +muscarina en verde y rojo, respectivamente). Estos resultados muestran que los efectos muscarínicos facilitadores previamente reportados en las iNEPs, se deben únicamente a los M_1 Rs. También sugieren que las acciones facilitadoras en las dNEPs se deben a ambos receptores M_1 y M_4 (Galarraga *et al.*, 1999; Pérez-Rosello *et al.*, 2005). La subsecuente administración de nicardipina $5 \mu\text{M}$ disminuyó el número de potenciales de acción en ambos tipo neuronales, debido a que los canales Ca_v1 se expresan en todas las NEPs (Figs. 16A, B +nicardipina en gris claro). Puesto que la nicardipina bloqueó el incremento del disparo de potenciales de acción producido por la activación de M_4 Rs observado en las dNEPs, también se demuestra que los canales Ca_v1 son los responsables de esta acción muscarínica (Pérez-Garci *et al.*, 2003). La gráfica en la figura 16C resume los resultados de una muestra de células tomadas de ambas clases de ratones BAC, donde se aprecia que la activación de los M_4 Rs incrementó de manera significativa la frecuencia de disparo en las dNEPs ($n = 6$; $F_{2,35} = 52.3$, $***P < 0.0001$;

ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Bonferroni $***P < 0.001$. La muscarina no tuvo efecto significativo en la frecuencia de disparo de la iNEPs (Fig. 16C; $n = 6$, NS), así que el efecto muscarínico en presencia de MT-7 fue significativamente mayor en las dNEPs en comparación con las iNEPs ($n = 12$; $***P = 0.0012$; prueba ANOVA de Kruskal-Wallis). Como era de esperar, el uso de 50 nM de MT-3 también bloquea este incremento de la excitabilidad en las dNEPs (no se muestra). Para concluir, el aumento en la corriente llevada por los canales Ca_v1 y debida a la activación de los M_4 Rs puede incrementar la frecuencia de disparo de las dNEPs cuando se usa estimulación directa o intracelular. A continuación se preguntó si la modulación inducida por los M_4 Rs también se puede observar durante la activación por estimulación sináptica.

Figura 16. El incremento de la corriente de Ca^{2+} llevada por los canales tipo Ca_v1 y mediado por los receptores M_4 aumenta la excitabilidad de las neuronas de la *vía directa*. A, B) de arriba abajo: estímulos de corriente despolarizante que provocan disparo de potenciales de acción tanto en las dNEPs (A) como en las iNEPs (B). Las condiciones control fueron elegidas para obtener el mismo número de potenciales de acción en ambos tipos neuronales (control en negro). 50nM de MT-7 fueron agregados para bloquear los receptores M_1 (+MT-7 en gris). Esta maniobra no cambió la frecuencia de disparo. A continuación se aplicó muscarina ($1 \mu M$) a la solución salina del baño de perfusión (+muscarina en verde y rojo). La muscarina indujo un incremento en la frecuencia de disparo de las dNEPs ($n = 6$) pero no en las iNEPs ($n = 6$). Al bloquear los canales Ca_v1 con nicardipina ($5 \mu M$) (+nicardipina en gris claro) se redujo el disparo en ambos tipos neuronales. Con este experimento se muestra que el bloqueo de estos canales previene la acción de los receptores M_4 sobre el disparo neuronal. C) La gráfica ilustra la frecuencia de disparo promedio en cada condición tanto en las dNEPs (verde) como en las iNEPs (rojo) identificadas con ratones transgénicos D_1 y D_2 -eGFP. Las diferencias fueron significativas.



Es sabido que las NEPs reciben entradas polisinápticas y convergentes que se pueden observar después de un sólo estímulo supraumbral dado en la corteza (Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Éstas respuestas sinápticas u ortodrómicas activan tanto dNEPs como iNEPs, así como interneuronas colinérgicas y de otro tipo durante un lapso de tiempo de varios cientos de milisegundos (Flores-Barrera *et al.*, 2010; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Las respuestas cortico-estriatales supraumbrales provocadas en las dNEPs son muy diferentes a las manifestadas por las iNEPs. Las respuestas de las dNEPs son más duraderas y disparan más PAs (Arias-García *et al.*, 2013; Flores-Barrera *et al.*, 2010; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Por lo tanto, un objetivo de los siguientes experimentos fue observar si la señalización mediada por los receptores muscarínicos es lo suficientemente rápida para intervenir en la regulación de las respuestas sinápticas de las NEPs. El otro objetivo fue observar si las respuestas sinápticas también pueden ser moduladas por los M₄Rs.

En las figuras 17A y B se muestra que respuestas sinápticas duran lo suficiente para detectar la modulación inducida por los GCPR muscarínicos (cf, Arias-García *et al.*, 2013; Pérez-Burgos *et al.*, 2008; 2010; Shen *et al.*, 2005). El bloqueo de los M₁Rs en las neuronas de ratones BAC D₁ and D₂-eGFP revela las acciones endógenas de la ACh (Galarraga *et al.*, 1999), la cual sostiene las despolarizaciones sinápticas con el fin de disparar trenes de PAs (figuras 17A y B: los trazos negros son las respuestas control y los trazos en gris son las respuestas en presencia de MT-7). Debido a que no se detectó actividad endógena de la ACh cuando se usó estimulación directa (Fig. 16, arriba), se infiere que la influencia muscarínica durante la respuesta sináptica se debe a la

activación cortical de la interneuronas colinérgicas (Galarraga *et al.*, 1999; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013).

En ambos tipos de neuronas, dNEPs ($n = 6$) e iNEPs ($n = 7$) las restas digitales de los controles menos los registros en presencia de MT-7 (los trazos debajo de los registros antes y durante MT-7) muestran que el bloqueo de los M_1 Rs disminuye la amplitud de la respuesta. Sin embargo, la influencia muscarínica pareció ser más importante en las dNEPs donde se abole el disparo repetitivo prolongado (Figs. 17A, B). En cambio, el típico y breve tren de potenciales de acción de las iNEPs casi no se ve afectado.

Las figuras 17C y D ejemplifican que, en presencia de MT-7, la muscarina fue capaz de restaurar la despolarización y el disparo en las dNEPs (en verde) sin ocasionar efecto en las iNEPs (en rojo), demostrando por tanto, que la despolarización muscarínica de las respuestas sinápticas en las dNEPs se debe a ambos receptores: M_1 y M_4 . La despolarización inducida por los M_4 Rs en las dNEPs pudo ser bloqueada tanto por 5 μ M nicardipina (Fig. 17E) como por 20 nM MT-3 (no ilustrado).

Para cuantificar mejor estos efectos se midieron las áreas bajo la respuesta sináptica supraumbral (mV·ms) (Flores-Barrera *et al.*, 2010; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). La adición de 50 nM de MT-7 al baño de perfusión disminuyó las respuestas en ambos tipos de célula dNEPs e iNEPs (Fig. 17F; ANOVA: $F_{2,38} = 11.7$; $**P = 0.001$ con prueba *post hoc* Bonferroni $***P < 0.001$; y ANOVA Friedman: $**P = 0.028$ con prueba *post hoc* Dunnett: $P < 0.05$).

Por otra parte, la muscarina restauró de manera significativa la despolarización sináptica en las dNEPs, induciendo el retorno del disparo repetitivo (diagrama de caja en la figura 17G: $F_{2,38} = 24.5$, $***P < 0.0001$; ANOVA

con prueba *post hoc* Bonferroni $**P < 0.001$. El disparo de las iNEPs no cambió de manera significativa luego de la adición de muscarina en presencia de MT-7 (Fig 17G).

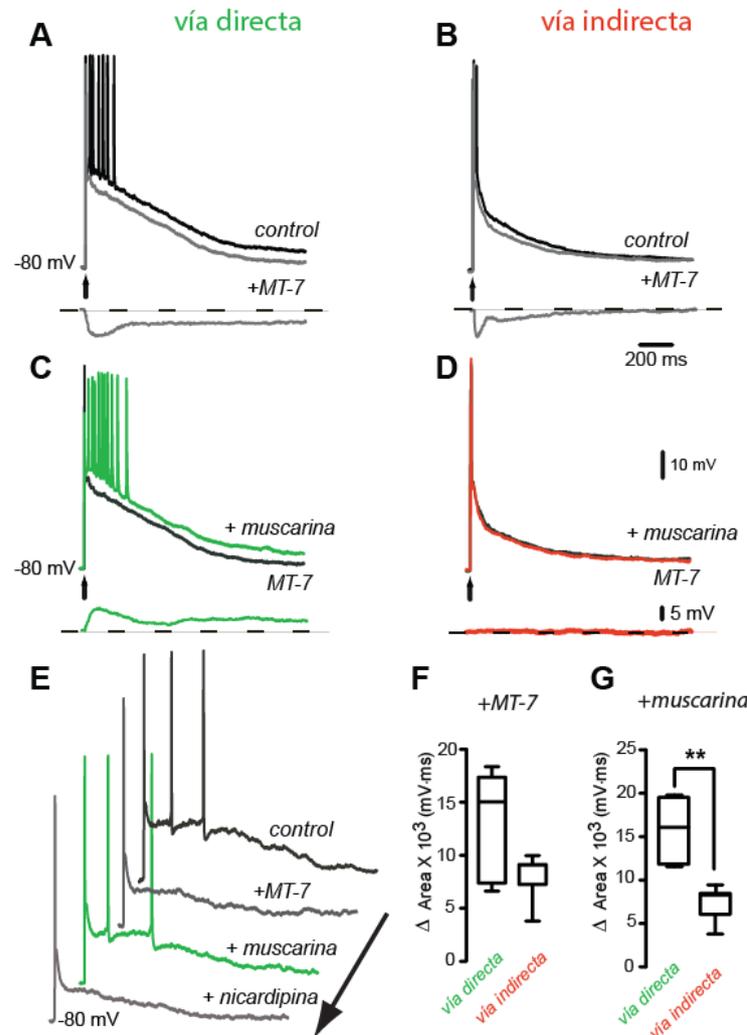


Figura 17. Las acciones muscarínicas pueden observarse en las respuestas sinápticas cortico-estriatales de las neuronas estriatales de proyección. A, B) Respuestas supraumbrales típicas de dNEPs (A, n = 6) e iNEPs (B, n = 7) corroborando que son diferentes (Flores-Barrera *et al.*, 2010). Los trazos negros son los controles. Los trazos grises son las respuestas después de la aplicación del antagonista a los receptores M_1 ; 50nM de MT-7. Se redujeron de manera significativa las respuestas supraumbrales en ambos tipos neuronales demostrando que las respuestas activadas de forma ortodrómicamente incluyen un componente de origen colinérgico metabotrópico. Los trazos inferiores en A y B son restas digitales ilustrando que la MT-7 hiperpolariza ambas respuestas. C, D) En la presencia continua de MT-7, se agregó 1 μM de muscarina al baño. Note que las dNEPs recuperaron parcialmente el disparo de potenciales de acción. Las restas digitales en la parte inferior indican que la muscarina despolarizó a las dNEPs (verde) pero no a las iNEPs (rojo). E) Registros de respuestas supraumbrales en una dNEP siguiendo la secuencia experimental (flecha): el disparo en condiciones control es reducido por MT-7, es restaurado por muscarina y es bloqueado por nicardipina. F) Los diagramas de caja indican los cambios en las áreas bajo las respuestas de ambos tipos neuronales después de agregar MT-7. G) Cuando se adicionó muscarina en presencia de MT-7 hubo un aumento del área bajo la respuesta de las dNEPs pero no de las iNEPs.

En conclusión, la señalización muscarínica mediada por proteínas G puede ser detectada durante respuestas sinápticas tal como se mostró previamente con los receptores dopaminérgicos (Flores-Barrera *et al.*, 2011). Además, debido a la diferente manera de generar las respuestas supraumbrales, la modulación producida por los M₄Rs durante las respuestas sinápticas puede observarse en las dNEPs pero no en las iNEPs. Es decir, la transmisión cortico-estriatal es una composición de activaciones ionotrópicas polisinápticas (Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013) junto con respuestas metabotrópicas que modulan las corrientes intrínsecas que se activan durante estas respuestas. Las respuestas muscarínicas en las dNEPs involucran la señalización de ambos receptores: M₁ y M₄. Por lo tanto, se justifica la investigación adicional que incluya el uso de los nuevos ligandos alostéricos (fuera del alcance del presente estudio). Acaso pudiera demostrarse que las acciones muscarínicas de las *vías directa* e *indirecta* pueden separarse en condiciones control y patológicas.

5.4 La activación de los receptores muscarínicos M₄ aumenta selectivamente la excitabilidad de las neuronas de la *vía directa* durante la actividad del circuito estriatal.

Aunque los estudios enfocados a una célula pueden exponer las acciones postsinápticas directas, la incoherencia entre estos estudios y los obtenidos a partir de células integradas en sus circuitos se presenta muy a menudo, mostrando una variabilidad inesperada (ver Carrillo-Reid *et al.* 2011). Por lo tanto, para observar si las acciones de los M₄Rs son lo suficientemente robustas como para preservarse a nivel del micro-circuito neuronal (López-

Huerta *et al.*, 2013; Plata *et al.*, 2013), se realizaron experimentos de imagenología de calcio en rebanadas cortico-estriatales usando *calcium orange* como indicador de Ca^{2+} y por tanto, de la actividad de docenas de neuronas simultáneamente, sin perder la resolución de célula única (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; 2009a; 2011; Jaidar *et al.*, 2010; Plata *et al.*, 2013). El *calcium orange* permite que la fluorescencia verde usada para identificar a las dNEPs (GFP+) no interfiera con la fluorescencia que refleja la actividad eléctrica de las neuronas (naranja). Se tomaron series de imágenes en campos del estriado dorsal (ver Métodos) y se obtuvieron secuencias de imágenes de 3 minutos de la actividad de la red, que se presenta en matrices de tipo rastreo (“*raster plots*”) (Figs. 18A GFP+, B GFP-).

Nuestro laboratorio ha descrito previamente que una de las acciones facilitadoras de los M_1Rs se debe a las corrientes entrantes persistentes de Na^+ (Carrillo-Reid *et al.*, 2009b). Por lo tanto, nos preguntamos si la corriente entrante a través de los canales Ca_v1 también podía inducir una acción facilitadora en la red incluso con los M_1Rs bloqueados.

En las gráficas de tipo rastreo o matrices de bits (“*raster plots*”) de las figuras 18A y B, el eje Y indica el número de neuronas registrado donde cada fila denota la actividad de una sola neurona a lo largo del tiempo (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). En el panel izquierdo de la figura 18A cada punto denota el disparo de una célula y la malla de puntos indica que hay actividad espontánea de un grupo de neuronas GFP+ (dNEPs, puntos verdes).

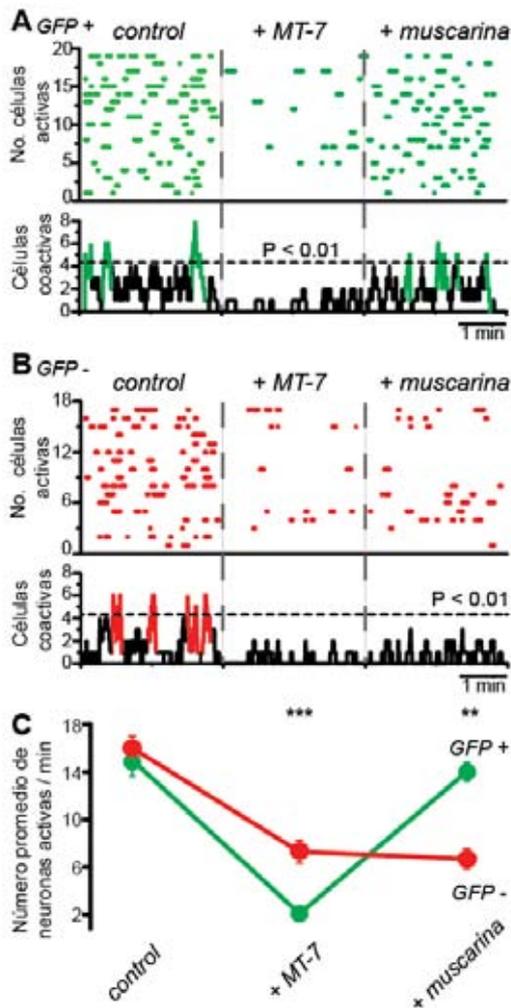


Figura 18. Los receptores M_4 activan selectivamente a las neuronas de la vía directa en el microcircuito activo. La imagenología de calcio con "calcium orange" permite la visualización de la actividad de varias neuronas simultáneamente sin la interferencia de la GFP. A) Gráfica tipo rastreo de la actividad de varias dNEPs (*GFP+*) de ratón BAC D_1 -eGFP. El eje Y muestra el número de neuronas visualizadas mientras que cada fila indica la actividad de una sola neurona, el eje X es el tiempo en segundos. Cada punto indica el disparo de una célula. Cada panel es un video de 3 minutos. Panel izquierdo: actividad control. Panel central: bloqueo de los receptores M_1 con MT-7 provocando que la actividad disminuya en las neuronas ya activadas. Panel derecho: la subsecuente aplicación de 1 muscarina μ M en presencia continua de MT-7 recuperó la actividad. El histograma inferior muestra picos significativos de actividad correlacionada (células coactivas) en el control. Los picos de co-activación se pierden en presencia de MT-7 y se recuperan al adicionar muscarina en presencia de MT-7 (en verde). B) La segunda gráfica muestra la actividad de neuronas *GFP-* del mismo experimento. Panel izquierdo: actividad control. Panel central: el bloqueo con MT-7 disminuyó la actividad neuronal. Panel derecho: la aplicación subsecuente de muscarina no restauró la actividad de las neuronas *GFP-*. El histograma muestra que estas células tuvieron picos significativos de co-activación sólo en condiciones control. C) Gráfica indicando la media \pm E.E.M del número promedio de neuronas activas por minuto para *GFP+* (verde) y *GFP-* (rojo). Las neuronas fueron tomadas del mismo experimento para mayor claridad. Las tres condiciones son: control, en presencia de MT-7 y MT-7 más muscarina. Note que sólo las células *GFP+* (dNEPs) respondieron a la muscarina cuando los receptores M_1 se bloquean.

El histograma en la parte inferior muestra la suma de los eventos de las neuronas que se activaron juntas en la misma ventana de tiempo o imagen. Note que cuando varias neuronas disparan juntas aparecen picos espontáneos y significativos de co-activación neuronal (panel izquierdo: picos significativos de disparo correlacionado en verde).

Tras la adición de 50 nM de MT-7 al baño de perfusión, la actividad neuronal se redujo (menos puntos) y los picos de las células coactivas desaparecieron (panel central), consistente con una pérdida del tono muscarínico (ACh endógena) presente durante actividad del microcircuito (Galarraga *et al.*, 1999; Carrillo-Reid *et al.*, 2009a). Por último, el panel derecho

muestra la acción de la muscarina ($1\mu\text{M}$) añadida en presencia continua de MT-7. La actividad se recuperó en gran medida y los picos de células coactivas reaparecieron (histograma en la parte inferior). Este efecto fue bloqueado con MT-3 en dos experimentos (no ilustrado).

La Figura 18B muestra un *raster plot* similar que ilustra la actividad espontánea de las neuronas GFP- (puntos rojos) tomadas del mismo experimento; de una rebanada de un ratón BAC D₁-eGFP. El panel izquierdo muestra la actividad control que presenta picos significativos de células coactivas (puntos rojos). El panel de en medio muestra que el bloqueo de los M₁Rs redujo esta actividad como en las células GFP+. Pero cuando la muscarina se añadió en presencia continua de MT-7 (panel derecho), la actividad no fue recuperada en las células GFP-. Debido a que estos experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro de ratones BAC D₁-eGFP (dNEPs) es lógico inferir que la mayoría de las células GFP- son iNEPs (aunque algunas interneuronas también pueden estar presentes). La gráfica en la figura 18C muestra la media \pm E.E.M de las neuronas activas por minuto luego de juntar las células activas provenientes de 4 rebanadas de diferentes animales ($n = 88$ neuronas GFP+, gráfica en verde y $n = 116$ neuronas GFP-, gráfica en rojo). La actividad promedio por minuto de las neuronas GFP+ y GFP- no presentó diferencias significativas en condiciones control, pero disminuyó significativamente en ambas poblaciones neuronales luego de la adición de MT-7 (50 nM) ($***P = 0.001$ comparado con sus respectivos controles; ANOVA con prueba *post-hoc* Bonferroni), sugiriendo que los receptores M₁Rs censan el tono de ACh endógeno durante la actividad control del microcircuito. Sin embargo, la divergencia se encontró cuando se agregó

muscarina (1 μ M) a la solución del baño: sólo las neuronas GFP+ recuperaron el nivel de actividad que tenían en presencia de MT-7 (** $P = 0.002$; ANOVA con prueba *post-hoc* Bonferroni). De hecho, las neuronas GFP- no cambiaron su nivel de actividad de manera significativa con respecto al tratamiento con MT-7. En neuronas GFP+ la actividad neuronal fue significativamente diferente con MT-7 co-aplicado con muscarina, comparada con neuronas GFP- ($P = 0.001$; Prueba *t* de Student con ajuste Bonferroni y prueba U de Mann-Whitney). Estos resultados indican que las acciones de los M₄Rs se pueden observar en la mayoría de las neuronas registradas de manera aislada o en rebanadas y siguen siendo predominantes durante la actividad del microcircuito y no son el resultado de centrarse en las células individuales (ver Carrillo-Reid *et al.*, 2011).

Resumiendo, se obtuvieron resultados consistentes para los efectos de los M₄Rs en neuronas disociadas, en el disparo evocado de manera directa con inyección de corriente, en el disparo evocado sinápticamente y en las neuronas disparando durante la función de microcircuito: la activación de los M₄Rs aumentó la actividad de dNEPs durante el bloqueo de los M₁Rs, pero no aumentó la actividad de iNEPs en las mismas condiciones. Es decir, la activación de los M₄Rs *selecciona a la vía directa*.

Debido a que las acciones de los M₄Rs provienen de incrementar la corriente Ca_v1, y dado que los receptores dopaminérgicos D₁ también modulan esta corriente y se expresan en los mismas dNEPs, se consideró importante saber si existe alguna posible interacción entre las modulaciones de los receptores M₄ y D₁.

5.5 Interacciones entre los receptores muscarínicos M_4 y dopaminérgicos

D_1 .

Las dNEPs co-expresan tanto D_1 Rs como M_4 Rs (Ince *et al.*, 1997; Jeon *et al.*, 2010). Se ha demostrado que los receptores M_4 Rs aumentan la corriente mediada por canales Ca_v1 y por lo tanto aumentan la excitabilidad de las dNEPs. Trabajos previos mostraron que la activación de los D_1 Rs produce acciones similares al aumentar la corriente a través de los mismos canales Ca_v1 (Bargas *et al.*, 1994; Flores-Barrera *et al.*, 2011; Galarraga *et al.*, 1997; Hernández-López *et al.*, 1997; Surmeier *et al.*, 1995). Por lo tanto, se cuestionó a continuación si estos efectos se producen mediante mecanismos que se añaden o mecanismos que se obstruyen entre sí, y si las posibles interacciones pueden depender del orden de activación de los receptores.

Para ello, se registraron dNEPs obtenidas de ratones BAC D_1 -eGFP que fueron estimuladas con pulsos de corriente despolarizante para evocar el disparo de PAs a un potencial de mantenimiento de -60mV y en presencia continua de 50 nM de MT-7 para bloquear los M_1 Rs (Fig. 19). De arriba hacia abajo, los trazos de voltaje en las Figuras 19A y B muestran el disparo de dNEPs en presencia de MT-7, después en presencia de muscarina (1 μ M, en verde) para activar a los M_4 Rs (Fig. 19A1 parte media) o en presencia de SKF-81297 (10 μ M, en azul), un agonista de los D_1 Rs (Fig. 19B1 parte media). La frecuencia de disparo incrementó en ambos casos. A continuación, el agonista SKF-81297 fue añadido a la célula previamente facilitada por la muscarina y en presencia continua de la misma (figura 19A2 parte inferior). La frecuencia de disparo incrementó aún más demostrando que la facilitación por la activación de los receptores muscarínicos y dopaminérgicos se puede sumar.

Al contrario, cuando la muscarina se adicionó a la célula luego de ser facilitada con SKF-81297, se produjo una reducción en la frecuencia de disparo ya aumentada por el agonista dopaminérgico (Fig.19B2). Es decir, la activación colinérgica-muscarínica revierte parcialmente la modulación dopaminérgica cuando se administra en segundo lugar.

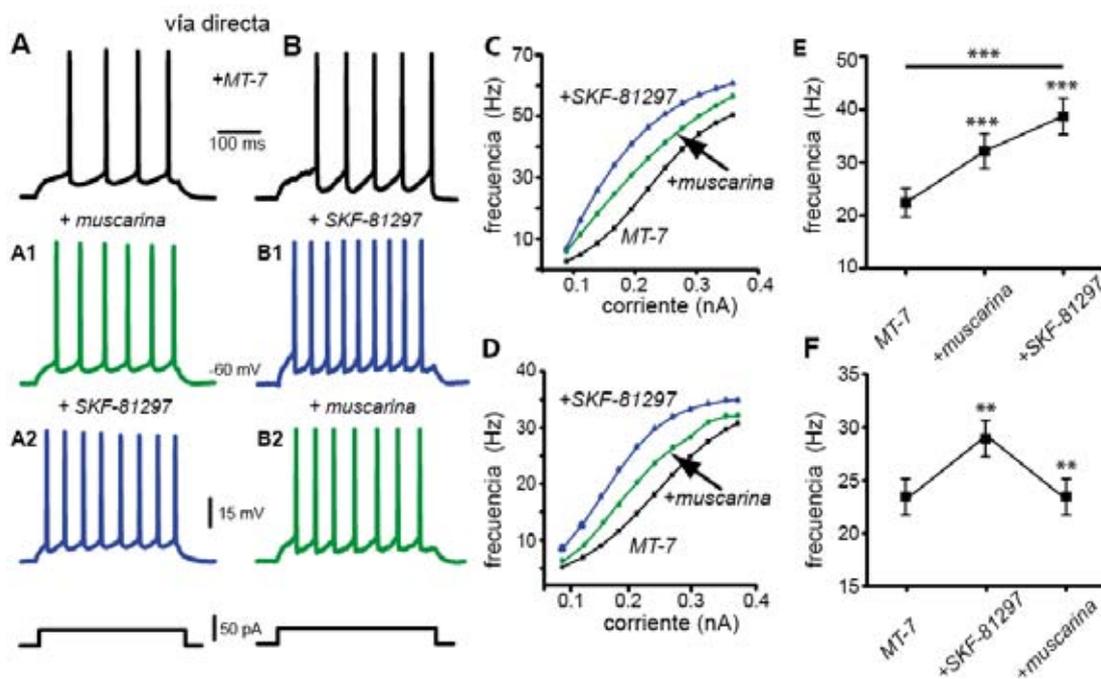


Figura 19. La interacción de las acciones colinérgica-muscarínica y dopaminérgica depende del orden de activación de los receptores. A, B) De arriba hacia abajo el disparo de potenciales de acción de dos dNEPs tomadas de ratones BAC D_1 -eGFP ante el mismo estímulo de corriente (trazo inferior). Los trazos superiores fueron registrados en presencia de 50 nM de MT-7 para bloquear los receptores M_1 (+MT-7, en negro). A continuación, en A1, se aplicó 1 μ M de muscarina lo que indujo un incremento de la frecuencia de disparo (+muscarina, en verde). En B2, se aplicaron 10 μ M de un agonista selectivo de los D_1 Rs (+SKF-81297, en azul) produciendo también un incremento en la frecuencia de disparo. La fila inferior muestra, en A2, lo que ocurre cuando el SKF-81297 es aplicado en presencia continua de muscarina: los efectos fueron aditivos y la neurona mostró un aumento adicional en su tasa de disparo. En B2, la aplicación de muscarina en presencia continua de SKF-81297 disminuyó la tasa de disparo. C) Gráficas intensidad-frecuencia (curvas I-F) representativas ilustrando las tres condiciones experimentales en orden: MT-7, muscarina y SKF-81297. D) Curva I-F representativa mostrando la secuencia: MT-7, SKF-81297 y muscarina. E) la gráfica resume la estadística de una muestra de dNEPs siguiendo la secuencia de activación de receptores muscarínicos (M_4) y dopaminérgicos (D_1). F) El resumen estadístico de una muestra de dNEPs siguiendo la secuencia de activación de receptores dopaminérgicos (D_1) y muscarínicos (M_4).

Por lo tanto, se ha encontrado que el orden de aplicación de los agonistas predice si la primera modulación va a ser facilitada o revertida por la acción del segundo agonista. Las figuras 19A y B muestran registros representativos con un pulso de corriente constante. Las figuras 19C y D

ilustran las curvas intensidad–frecuencia (curvas I-F) para cada condición. Estas gráficas muestran que cuando la muscarina se añadió en primer lugar, las acciones del agonista D₁R fueron aditivas en todo el rango de frecuencias (note como la curva I-F se corrió a la izquierda con respecto a las curvas con MT-7 y la de muscarina, mostrando el efecto facilitador). Sin embargo, cuando la muscarina se agregó en segundo lugar ésta produjo una disminución de la modulación dopaminérgica previa (ahora la curva se corrió a la derecha con respecto a aquellas con MT-7 y SKF-81297). En la figura 19E se resumen los efectos de los agonistas en una muestra de dNEPs cuando el agonista muscarínico precede al dopaminérgico (M₄-D₁). La frecuencia de disparo promedio (a la mitad de la curva I-F) con MT-7 fue de 24 ± 2 Hz, al añadir muscarina de 34 ± 3 Hz y al añadir SKF-81297 en presencia de muscarina llegó a 41 ± 2 Hz; la suma de las acciones M₄R y D₁R fue significativa ($n = 9$; ANOVA $F_{2,26} = 90.6$, $***P = 0.0001$ con prueba *post hoc* Bonferroni : $***P = 0.0001$ para muscarina, $***P = 0.0001$ para muscarina más SKF-81297).

La figura 19F resume una muestra de experimentos con el orden de los agonistas invertido, la frecuencia de disparo promedio con MT-7 fue de 23 ± 1 Hz, al añadir SKF-81297 llegó a 29 ± 1 Hz y al añadir muscarina en presencia de SKF-81297 regresó a 23 ± 1 Hz. El incremento en la frecuencia de disparo provocado por el agonista dopaminérgico SKF-81297 fue significativo ($n = 8$; ANOVA $F_{2,23} = 13.5$, $***P = 0.0005$, con prueba *post hoc* Bonferroni $**P < 0.05$ para SKF-81297; la prueba ANOVA -Friedman arrojó $**P = 0.018$). Para SKF-81297 más muscarina la frecuencia no fue significativamente diferente a la condición inicial. Estos resultados son consistentes con una inhibición de las acciones dopaminérgicas cuando son seguidas de las acciones muscarínicas.

Los resultados observados con estos experimentos, mostraron la existencia de una interacción entre los receptores M_4 y D_1 en dNEPs, tal como se planteó en este trabajo de tesis. Y a partir de ellos puede hipotetizar cuál es su utilidad en la fisiología estriatal como regulador de la excitabilidad neuronal de la *vía directa*, tanto para facilitarla como disminuirla según el circuito lo requiera. Así mismo su aplicación en la terapéutica de la EP ya que el efecto sinérgico M_4 - D_1 podría ayudar a restaurar la actividad de las dNEPs y restablecer el balance entre las *vías directa* e *indirecta*. Sin embargo, se requiere aclarar los detalles de señalización de esta interacción, por ello este trabajo da pauta a otro proyecto de investigación.

6. DISCUSIÓN

Las modulaciones dopaminérgica y colinérgica-muscarínica producen una regulación muy importante de las actividades neuronal, sináptica y de circuito en el neostriado (Aosaki *et al.*, 2010). Sin embargo, debido a que en la EP la disminución de DA ocurre junto con un incremento de la concentración tónica de ACh, es habitual pensar que las transmisiones dopaminérgica y colinérgica son “opuestas” (Ding *et al.*, 2006) y que el circuito en presencia de enfermedad sufre un “desbalance” (Aosaki *et al.*, 2010; Pisani *et al.*, 2007). En el presente estudio mostramos que dicho antagonismo no es necesariamente cierto. Sino que las acciones dependen del contexto.

Con la ayuda de dNEPs e iNEPs obtenidas de ratones transgénicos BAC D_1 y D_2 -eGFP (Gerfen y Surmeier, 2011; Gerfen y Young, 1988) y de toxinas muscarínicas muy selectivas (Jerusalinsky *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2000), observamos las acciones de los M_4 Rs en neuronas identificadas: 1)

Incrementan la corriente de Ca^{2+} a través de los canales Ca_v1 en dNEPs pero no en iNEPs, 2) Este efecto incrementó la excitabilidad y el disparo evocado en dNEPs cuando el disparo de PAs fue provocado con inyecciones directas de corriente o sinápticamente; 3) Durante la activación sináptica la activación del tono colinérgico-muscarínico debido a la liberación de ACh endógena (Galarraga *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2012) fue desenmascarado por la adición de MT-7, un antagonista específico de los M_1Rs , 4) las dNEPs también fueron facilitadas por un tono colinérgico durante la dinámica espontánea del microcircuito tal como se reveló con imagenología de calcio: la presencia de MT-7 redujo bastante la actividad de la red. Pero la actividad del microcircuito pudo ser restaurada exclusivamente en las neuronas de la *vía directa* por la activación de los M_4Rs , 5) las interacciones asimétricas entre los receptores M_4 y D_1 son aditivas cuando el agonista muscarínico precedió al dopaminérgico, y devaluativas cuando se inició la activación muscarínica después de la acción dopaminérgica.

6.1 Modulación de los canales Ca_v1 por los receptores muscarínicos

M_4 .

Entre las muchas acciones electrofisiológicas de la DA en las neuronas y circuitos estriatales (Surmeier *et al.*, 2011; Tritsch y Sabatini, 2012), la potenciación postsináptica de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales Ca_v1 por la activación de los D_1Rs en dNEPs, y la disminución de la misma corriente debido a la activación de los D_2Rs en iNEPs, fueron de las primeras en ser descritas (Hernández-López *et al.*, 1997, 2000). Dichas acciones tienen un impacto directo en la excitabilidad de las NEPs (Pérez-Garci *et al.*, 2003) y son

coherentes, a nivel celular, con un modelo de los GB que está altamente conservado a través de la evolución de los vertebrados (figura 1): la DA facilita el disparo de las dSPNs mientras que deprime el disparo de las iSPNs (Albin *et al.*, 1989; Barral *et al.*, 2010; DeLong, 1990; Ericsson *et al.*, 2013; Kravitz *et al.*, 2010; Obeso *et al.*, 2000). Sin embargo, este modelo no ha estado exento de controversias: mientras que la activación o inhibición de dSPNs o iSPNs por agonistas dopaminérgicos es evidente en estudios a nivel celular (Hernández-López *et al.*, 1997, 2000), la investigación sobre las preparaciones más completas que incluyen al circuito estriatal encuentran con frecuencia respuestas mixtas o invertidas (p.ej., Burkhardt *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2008; ver Carrillo-Reid *et al.*, 2011 para una posible explicación). Debido a este problema, el presente estudio se enfocó en observar la robustez de las acciones de los M₄Rs utilizando diferentes preparaciones en lugar de explorar los mecanismos de señalización en la misma preparación; lo que constituye un primer punto que se deja para un futuro estudio.

La modulación colinérgica-muscarínica incrementa la excitabilidad y facilita el disparo en ambos tipos de NEPs (Galarraga *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2012; Pisani *et al.*, 2007; Pérez-Rosello *et al.*, 2005). Estas acciones han sido atribuidas a los M₁Rs (Goldberg *et al.*, 2012) y son mediadas por la disminución directa de corrientes de K⁺ o bien, por la reducción de corrientes de Ca²⁺ que pueden activar canales de K⁺ (Arias-García *et al.*, 2013; Howe y Surmeier, 1995; Pérez-Burgos *et al.*, 2008; 2010; Pérez-Rosello *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; 2007; Vilchis *et al.*, 2000). También las corrientes entrantes y persistentes de Na⁺ han sido implicadas (Carrillo-Reid *et al.*, 2009b). Esta evidencia ha justificado el uso terapéutico de fármacos anticolinérgicos en la

EP (Pisani *et al.*, 2007), donde las iNEPs están hiperactivadas (Fig. 11). Este estudio muestra nueva evidencia validando estos hallazgos durante el disparo neuronal evocado sinápticamente y durante la actividad del microcircuito. Sin embargo, los antagonistas M₁R, tienen como blanco a las neuronas de ambas vías, y si bien frenarían la hiperactividad de las iNEPs, también reforzarían la inactividad de las dNEPs. Quizás esta es una razón que ha evitado el éxito de los antagonistas muscarínicos como coadyuvantes en la terapéutica de la EP. Se ha demostrado en este trabajo de Tesis que la activación de los M₄Rs, al actuar de manera selectiva sobre la dNEPs, podrían reactivar la *vía directa*. Así que por obvias razones, podrían significar un nuevo intento de re-introducir las drogas muscarínicas en la práctica: antagonistas selectivos a M₁R (como la telenzepina que ya está en el mercado) más agonistas selectivos a M₄R (la exploración de los nuevos fármacos alostéricos es otro punto que esta Tesis deja abierto para la investigación futura), en lugar de seguir usando antimuscarínicos no específicos.

La nueva acción colinérgica que reportamos, específica de las dNEPs y resultante de la activación de los M₄Rs, es el incremento de la corriente de Ca²⁺ a través de canales Ca_v1 (ver Pemberton y Jones, 1995), demostrado con el uso de una dihidropiridina que ocluye las acciones de los M₄Rs. Estos canales son activados por voltaje y modulados por DA (Hernández-López *et al.* 1997; 2000; Surmeier *et al.*, 2011). Los canales Ca_v1 han sido tradicionalmente ligados a cascadas de señalización citosólicas (Surmeier *et al.*, 1994), y de hecho, no observamos mecanismos dependientes de voltaje para explicar la modulación. Tal como se esperaba, el incremento en la corriente de los canales Ca_v1 por la activación de los M₄Rs, exacerbó la excitabilidad con el mismo

estímulo en las dNEPs (Pérez-Garci *et al.*, 2003), ya sea con inyecciones de corriente directa o durante activación sináptica que involucra despolarización dendrítica (Flores-Barrera *et al.*, 2010; 2011). Ahora bien, si estos efectos persisten en individuos con EP queda como otro tema abierto. Para probar esta hipótesis se requiere del empleo de modelos animales de la EP y de nuevo, la exploración de los nuevos ligandos alostéricos muscarínicos (Digby *et al.*, 2010).

Los efectos inducidos por la muscarina a pesar de que los M₁Rs estaban bloqueados con MT-7, recuperaron la actividad de la *vía directa*, y fueron bloqueados por un antagonista específico de los M₄Rs, la toxina MT-3 (Bradley, 2000; Jerusalinsky *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2000 Purkerson y Potter, 1998). En presencia de ambos antagonistas, MT-7 y MT-3, todas las acciones muscarínicas fueron bloqueadas en las dNEPs, confirmando que son los únicos receptores expresados funcionalmente en estas células.

Por otro lado, los receptores de la familia M₂ controlan la liberación de ACh en las interneuronas colinérgicas e inhiben presinápticamente la liberación de glutamato desde las sinapsis cortico-estriatales (Hernández-Echeagaray *et al.*, 1998; Galarraga *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2006; 2010; Higley *et al.*, 2009; Pakhotin y Bracci, 2007). Por lo tanto, un antagonista no específico de los mAChR que bloquee a los M₄Rs podría incrementar la liberación de ACh por parte de las interneuronas y de glutamato desde las conexiones cortico-estriatales y por ende aumentar la excitabilidad de las NEPs. Estos efectos se oponen al efecto benéfico de bloquear los M₁Rs para reducir la hiperexcitabilidad en las iNEPs. Otra razón por la que el uso de antagonistas no específicos no da los resultados esperados.

Pero como se explicó arriba, dicho antagonismo funcional entre los receptores de las familias M_2 y M_1 es válido tanto para las dNEPs como para las iNEPs (Doig *et al.*, 2010). Consecuentemente, un agonista específico de los M_4 Rs cuyo blanco sea únicamente la *vía directa*, podría ser la solución a este problema.

Las respuestas a la estimulación cortical sugieren que las interneuronas colinérgicas participan en la actividad cortico-estriatal polisináptica (Ding *et al.*, 2006; 2010; Pakhotin y Bracci, 2007; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013) al activar receptores muscarínicos M_1 y M_4 en dNEPs, M_1 en iNEPs, M_2 y M_3 en sinapsis cortico-estriatales (Calabresi *et al.*, 1998; Hernández-Etcheagaray *et al.*, 1998) y $M_{2/4}$ en las interneuronas colinérgicas (Ding *et al.*, 2006, Kreitzer, 2009, Hersch *et al.*, 1994). ¿Cuál de todos estos efectos es el predominante?

Para averiguarlo utilizamos registros multicelulares de imagenología de Ca^{2+} (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; 2009a) y demostramos que el efecto que queda con el circuito andando es la disminución en la actividad de red cuando los M_1 Rs fueron bloqueados con MT-7. La recuperación de la actividad de red sucede exclusivamente en las dNEPs.

6.2 Posible relevancia fisiológica.

El neostriado es el principal núcleo de entrada de los GB. Las principales aferentes glutamatérgicas corticales (y talámicas) llegan al neostriado y hacen contactos monosinápticos con NEPs e interneuronas (Kawaguchi *et al.*, 1995; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Las interneuronas se activan después de breves latencias por terminales profusas (Sizemore *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 1998; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013), mientras que las NEPs reciben uno o dos

botones de cada aferente cortical y responden mono y polisinápticamente (Cowan y Wilson, 1994; Doig *et al.*, 2010; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Las respuestas supraumbrales pueden durar cientos de milisegundos (Flores-Barrera *et al.*, 2010), posiblemente incluyendo entradas de interneuronas (Flores-Barrera *et al.*, 2010; Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013) y acciones moduladoras por la participación de señalización dependiente de GPCR, tal como aquella proveniente de los m-AChR (Arias-García *et al.*, 2013; Galarraga *et al.*, 1999). La participación de la modulación dopaminérgica durante esta actividad sináptica ya ha sido demostrada (Flores-Barrera *et al.*, 2011; Galarraga *et al.*, 1997).

Debido a que tanto los receptores D₁ como M₄ incrementan la corriente a través de los canales Ca_v1, es interesante estudiar las interacciones entre ellos. En el presente estudio encontramos que las acciones de ambos receptores se suman cuando la activación muscarínica ocurre primero. Esto es interesante ya que la modulación dopaminérgica también puede ser activada desde la corteza (Bertram *et al.*, 2014; deLafuente y Romo, 2012) con mayores latencias que las necesarias para activar a las interneuronas colinérgicas (Vizcarra-Chacón *et al.*, 2013). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que cuando el estriado se activa desde la corteza, sería de esperar que las modulaciones muscarínicas y dopaminérgicas puedan actuar en secuencia para inducir efectos aditivos.

Esto también puede ocurrir en las terminales locales, ya que la liberación de ACh puede desencadenar la liberación de DA (Threlfell y Cragg, 2011).

Pero la modulación colinérgica también puede venir desde el tallo cerebral (Dautan *et al.*, 2014). Tal vez, en este caso, la modulación de los m-

AChR se puede establecer después de la activación dopaminérgica. En tal caso, las acciones de la DA pueden ser restringidas (Shultz, 2007). Por lo tanto, el llamado "balance" entre los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos necesita una re-evaluación.

Esta interpretación funcional está apoyada por las vías conocidas desde el neocórtex hacia la corteza y el tallo cerebral (Takakusaki, 2013). De hecho, la señalización de los M₄Rs puede ir en ambas direcciones, dependiendo de la proteína G activada: puede depender de la activación de la AC para potenciar la señalización de la DA (Nathanson, 2000), o puede ayudar para inactivar a la AC haciendo lo contrario (Onali y Olanas, 2002).

Los resultados recolectados en el presente estudio ayudan a un mayor entendimiento del papel colinérgico-muscarínico en las dNEPs, especialmente de los M₄Rs, que junto a los M₁Rs modulan de manera importante la excitabilidad de las NEPs. A su vez, han contribuido al estudio de la interacción existente entre los receptores muscarínicos y dopaminérgicos, en particular de los M₄Rs y D₁Rs. Con lo cual se ha dado un preámbulo para inferir nuevas y mejores estrategias de tratamiento para situaciones patológicas, como la enfermedad de Parkinson al ofrecer nuevas perspectivas para estudiar la fisiopatología de la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, J.J., Rueda-Orozco, P.E., Hernández, R., Plata, V., Ibañez-Sandoval, O., Galarraga, E., Bargas, J., 2011. Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front Syst Neurosci* 5, 6.
- Adem, A., Karlsson, E., 1997. Muscarinic receptor subtype selective toxins. *Life Sci* 60,1069-1076.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends. Neurosci.* 12, 366 -375.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1995. The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends. Neurosci.* 18, 63-64.
- Arikkath, J., Campbell, K.P., 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., Masuda, M., 2010. Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr. Gerontol. Int.* 1,148 -157.
- Arias-García, M.A., Tapia, D., Flores-Barrera, E., Pérez-Ortega, J.E., Bargas, J., Galarraga, E., 2013. Duration differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on calcium activated potassium currents. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 63.
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., Surmeier, D.J., 1994. Cellular and molecular characterization of Ca^{2+} currents in acutely-isolated, adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* 14, 6667- 6686.
- Barral, J., Galarraga, E., Tapia, D., Flores-Barrera, E., Reyes, A., Bargas, J., 2010. Dopaminergic modulation of spiny neurons in the turtle striatum. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 743 -750.

- Bennet, B.D., Wilson, C.J., 2000. Synaptology and physiology of neostriatal neurons. In: Brain dynamics and striatal complex (Miller, R., Wickens, J.R., eds), pp 11-140. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Bertram, C., Dahan, L., Boorman, L.W., Harris, S., Vautrelle, N., Leriche, M., Redgrave, P., Overton, P.G., 2014. Cortical regulation of dopaminergic neurons: role of the midbrain superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 111, 755 -767.
- Bezprozvanny, I., Tsien, R.W., 1995. Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca^{2+} channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol. Pharmacol.* 48 (3): 540–9.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A.C., Bevan, M.D. 2000. Synaptic organization of the basal ganglia. *J. Anat.* 196: 527-542.
- Bonci, A., Hopf, F.W., 2005. The dopamine D2 receptor: new surprises from an old friend. *Neuron.* 47(3):335-8.
- Bradley, K.N., 2000. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol. Ther.* 85, 87-109.
- Burkhardt, J.M., Jin, X., Costa, R.M., 2009. Dissociable effects of dopamine on neuronal firing rate and synchrony in the dorsal striatum. *Front Integr Neurosci* 3, 28.
- Byun NE, Grannan M, Bubser M, Barry RL, Thompson A2, Rosanelli J, Gowrishankar R, Kelm ND, Damon S, Bridges TM, Melancon BJ, Tarr JC, Brogan JT, Avison MJ, Deutch AY, Wess J, Wood MR, Lindsley CW, Gore JC, Conn PJ, Jones CK. 2014. Antipsychotic drug-like effects of the selective M4 muscarinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator VU0152100. *Neuropsychopharmacology.* 39(7):1578-93.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G., 1998. Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *Eur J Neurosci.* 10,3020-3.

- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2008. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Bargas, J., 2009a. Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737-49.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., Bargas, J., 2009b. Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 682-690.
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* 31, 14972-14983.
- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall, W.A., Pérez-Reyes, E., Snutch, T.P., Striessnig, J., 2005. International Union of Pharmacology XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.
- Caulfield, M.P., 1993. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58:319-379.
- Caulfield, M.P., Birdsall, N.J.M. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharm. Rev.* 50,279-290.
- Centonze, D., Bracci, E., Pisani, A., Gubellini, P., Bernardi, G., Calabresi, P., 2002. Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 15:2049–52.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058.
- Clapham, D.E., Neer, E.J., 1997. G proteins $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203.

- Contant, C., Umbriaco, D., Garcia, S., Watkins, K.C., Descarries, L., 1996. Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 71, 937-947.
- Cowan, R.L., Wilson, C.J., 1994. Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J. Neurophysiol.* 71, 17-32.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., Mena-Segovia, J., 2014. A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509-4518.
- de Lafuente, V., Romo, R., 2012. Dopaminergic activity coincides with stimulus detection by the frontal lobe. *Neuroscience* 218, 181-184
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends. Neurosci.* 13, 281-285.
- DeLong, M.R., Wichmann, T., 2007. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol.* 64:20-4.
- Dencker, D., Thomsen, M., Wörtwein, G., Weikop, P., Cui, Y., Jeon, J., Wess, J., Fink-Jensen, A., 2012. Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes as Potential Drug Targets for the Treatment of Schizophrenia, Drug Abuse and Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 3(2):80-89.
- Ding, J., Guzman, J.N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J.A., Ebert, P.J., Levitt, P., Wilson, C.J., Hamm, H.E., Surmeier, D.J., 2006. RGS4-dependent attenuation of M₄ autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat. Neurosci.* 9, 832-842.

- Ding, J.B., Guzman, J.N., Peterson, J.D., Goldberg, J.A., Surmeier, D.J., 2010. Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* 67, 294–307.
- Digby, G.J., Shirey, J.K., Conn, P.J., 2010. Allosteric activators of muscarinic receptors as novel approaches for treatment of CNS disorders. *Mol. BioSyst.* 6, 1345–1354.
- Döbrössy, M., Klein, A., Janghra, N., Nikkhah, G., Dunnett, S.B., 2011. Validating the use of M4-BAC-GFP mice as tissue donors in cell replacement therapies in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci Methods.* 197(1):6-13.
- Doering, C.J., Zamponi, G.W., 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.
- Doig, N.M., Moss, J., Bolam, J.P., 2010. Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J. Neurosci.* 30, 14610-14618.
- Dolan, R.J., Dayan, P., 2013. Goals and habits in the brain. *Neuron.* 80:312-25.
- 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.
- Double, K.L., 2012. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 18 Suppl 1:S52-4.
- Dreyer, J.K., Herrik, K.F., Berg, R.W., Hounsgaard, J.D., 2010. Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci.* 30(42):14273-83.
- Eglen, R.M., 2006. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonomic & Autacoid Pharmacology.* 26, 219–233.
- Ericsson, J., Stephenson-Jones, M., Pérez-Fernández, J., Robertson, B., Silberberg, G., Grillner, S., 2013. Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in lamprey. *J. Neurosci.* 33, 8045-8054.

- Eyster, K.M., 2007. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* 31:5-16.
- Felder, C.C., 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9:619-625.
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B.J., Tapia, D., Bargas, J., Galarraga, E., 2010. Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 4,15.
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B.J., Bargas, J., Tapia, D., Galarraga, E., 2011. Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 5,15.
- Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Marquer, C., Ménez, A., Servent, D., 2006. Identification of various allosteric interaction sites on M₁ muscarinic receptor using 125I-Met35-oxidized muscarinic toxin 7. *Mol. Pharmacol.* 69, 1641-1651.
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Barral, J., Bargas, J., 1997. Dopamine facilitates striatal 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., 1999. Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J. Neurosci.* 19, 3629-3638.
- Gerfen, C.R., 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neurosci.* 9,2,157-158.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr., Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerfen, C.R., Surmeier, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 441-466.

- Gerfen, C.R., Young, W.S.^{3rd}, 1988. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460,161-167.
- Gertler, T.S., Chan, C.S., Surmeier D.J., 2008. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* 28, 10814-24.
- Goldberg, J.A., Ding, J.B., Surmeier, D.J., 2012. Muscarinic modulation of striatal function and circuitry. *Handb. Exp. Pharmacol.* 208, 223-241.
- Graybiel, A.M., 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci.* 31:359-87.
- Grillner, S., Hellgren, J., Menard, A., Saitoh, K., Wikstrom, M.A., 2005. Mechanisms for selection of basic motor programs-roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci.* 28, 364-70.
- Guo, M.L., Mao,L.M., Wang,J.Q., 2010. Modulation of M4 muscarinic acetylcholine receptors by interacting proteins. *Neurosci. Bull.* 26;469-473.
- Haga, T., 2013. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc. Jpn.Acad.Ser. B.* 89,226-256.
- Harikrishna Reddy, D., Misra, S., Medhi, B., 2014. Advances in drug development for Parkinson's disease: present status. *Pharmacology.*93(5-6):260-71.
- Harvey, A.L., Bradley, K.N., Cochran, S.A., Rowan, E.G., Pratt, J.A., Quillfeldt, J.A., Jerusalinsky, D.A., 1998. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicol* 36:1635-1640.
- Havekes, R., Abel, T., Van der Zee, E.A., 2011. The cholinergic system and neostriatal memory functions. *Behav Brain Res.* 221(2):412-23.
- 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-González, O., Hernández-Flores, T., Prieto, G.A., Pérez-Burgos, A., Arias-García, M.A., Galarraga, E., Bargas, J., 2014. Modulation of Ca²⁺-currents by

- sequential and simultaneous activation of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in striatal projection neurons. *Purinergic Signalling* 10, 269-281.
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A., Galarraga, E., 1997. D₁ 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-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., Surmeier, D.J., 2000. D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *J. Neurosci.* 20, 8987- 8995.
- Hersch, S.M., Gutekunst, C.A., Rees, H.D., Heilman, C.J., Levey, A.I., 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.
- Higley, M.J., Soler-Llavina, G.J., Sabatini, B.L., 2009. Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci* 12, 1121–1128.
- Hille, B., 2001. Modulation, slow synaptic action, and second messengers. In: *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed. (Sinauer), pp. 201-236 Sunderland.
- Howe, A.R., Surmeier, D.J., 1995. Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J. Neurosci.* 15, 458-469.
- Huang, L., Keyser, B.M., Tagmose, T.M., Hansen, J.B., Taylor, J.T., Zhuang, H., Zhang, M., Ragsdale, D.S., Li, M., 2004. NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 309:193-9.
- Hulme, E.C., 1990. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. *Symp Soc Exp Biol* 44:39-54.

- Hwang, O., 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol*: 11–17.
- Ince, E.B., Ciliax, B.J., Levey, A.I., 1997. Differential expression of D₁ and D₂ dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27, 357-366.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A., 2010. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J. Neurosci.* 30, 11326-11336.
- Jeon, J., Dencker, D., Wörtwein, G., Woldbye, D.P.D., Cui, Y.H., Davis, A.A., 2010. A subpopulation of neuronal M₄ muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J. Neurosci.* 30, 2396-2405.
- Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., Alfaro, P., Quillfeldt, J., Ferreira, A., Rial, V.E., Duran, R., Cerveñansky, C., 2000. Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon.* 38, 747-761.
- Karczmar, A.G., 1996. The Otto Loewi Lecture. Loewi's discovery and the XXI century. *Prog Brain Res* 109:1-27.
- 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, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends. Neurosci.* 18, 527-535.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C., 1990. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421-3438.
- Koos, T., Tepper, J.M., 2002. Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22:529-535.

- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622- 626.
- Kreitzer, A., 2009. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32.127-47.
- Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T., 2009. Parkinson's disease. *Lancet* . 373, 2055-66.
- Lim, S.A., Kang, U.J., McGehee, D.S., 2014. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front Synaptic Neurosci* ;6:22.
- Liang, L., DeLong, M.R., Papa, S.M., 2008. Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* 28, 7537–7547.
- Lipkind, G.M., Fozzard, H.A., 2003. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca^{2+} channel. *Mol Pharmacol.* 63(3):499-511.
- Lipscombe, D., Helton, T. D., Xu, W., 2004. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol.* 92, 2633-41.333
- López-Huerta, V.G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordelisio, T., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2013. The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J. Neurosci.* 33, 4964-4975.
- Lucas-Meunier, E., Fossier, P., Baux, G., Amar, M., 2003. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch* 446:17-29.
- Luchicchi, A., Bloem, B., Viaña, J.N., Mansvelder, H.D., Role, L.W., 2014. Illuminating the role of cholinergic signaling in circuits of attention and emotionally salient behaviors. *Front Synaptic Neurosci* ;6:24.
- Martella, G., Spadon, F., Sciamanna, G., Tassone, A., Bernardi, G., Pisani, A., Bonsi, P. 2008. Age-related functional changes of high-voltage-activated calcium channels in different neuronal subtypes of mouse striatum. *Neurosci.* 152, 469-76
- Mercuri, N.B., Bernardi, G., 2005. The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci*, 26, 341-4.

- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78, 189-225.
- Muñoz-Manchado, A.B., Foldi, C., Szydlowski, S., Sjulson, L., Farries, M., Wilson, C., Silberberg, G., Hjerling-Leffler, J., 2014. Novel Striatal GABAergic Interneuron Populations Labeled in the 5HT3aEGFP Mouse. *Cereb Cortex*. doi:10.1093/cercor/bhu179.
- Nathanson, N.M., 2000. A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6245-6247.
- Neubig, R.R., Siderovsky, D.P., 2002. Regulators of G-protein signaling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 1:187-197.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H., 2004. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res.* 24:165–205.
- Nisenbaum, E.S., Wilson, C.J., Foehring, R.C., Surmeier, D.J., 1996. Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 76, 1180 –1194.
- Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Rodríguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., Olanow, C.W., 2000. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, 8-19.
- Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M., Marin, C., Alonso, F., Zamarbide, I., Lanciego, J.L., Rodríguez-Díaz, M., 2004. The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology* 62:S17–S30.
- Onali, P., Olanas, M.C., 2002. Muscarinic M₄ receptor inhibition of dopamine D₁-like receptor signalling in rat nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 105-111.
- Pakhotin, P., Bracci, E., 2007. Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum. *J Neurosci* 27, 391–400.
- Parker, P.J., Murray-Rust, J., 2004. PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131-132.

- Pemberton, K.E., Jones, S.V.P., 1995. Enhancement of an L-type calcium current in AtT-20 cells; a novel effect of m4 muscarinic receptor. *Pflugers. Arch.* 429, 699-707.
- Pérez-Burgos, A., Pérez-Rosello, T., Salgado, H., Flores-Barrera, E., Prieto, G.A., Figueroa, A., Galarraga, E., Bargas, J., 2008. Muscarinic M₁ modulation of N and L types of calcium channels is mediated by PKC in neostriatal neurons. *Neurosci.* 155, 1079-1097.
- Pérez-Burgos, A., Prieto, G.A., Galarraga, E., Bargas, J., 2010. Ca_v2.1 channels are modulated by muscarinic M₁ receptors through phosphoinositide hydrolysis in neostriatal neurons. *Neuroscience* 165, 293-299.
- Pérez-Garci, E., Bargas, J., Galarraga, E., 2003. The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14,1253-1256.
- Pérez-Rosello, T., Figueroa, A., Salgado, H., Vilchis, C., Tecuapetla, F., Guzman, J.N., Galarraga, E., Bargas, J., 2005. Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of Ca_v2.1 and Ca_v2.2 Ca²⁺ channels. *J. Neurophysiol.* 93, 2507–2519.
- Pineda, J.C., Bargas, J., Flores-Hernández, J., Galarraga, E., 1995. Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarizing potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281:271–277.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J., Hernández-Martinez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2013. Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 78.
- Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., Surmeier, D.J., 2007. Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci.* 30, 545-553.
- Prensa, L., Parent, A., 2001. The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J. Neurosci.* 21, 7247-7260.

- Prieto, G.A., Pérez-Burgos, A., Fiordeliso, T., Salgado, H., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2009. Dopamine D₂-class receptor supersensitivity as reflected in Ca²⁺ current modulation in neostriatal neurons. *Neurosci.* 164, 345-350.
- Prieto, G.A., Pérez-Burgos, A., Palomero-Rivero, M., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2011. Upregulation of D₂-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D₃ receptors acting on Ca_v2.1 channels via PIP₂ depletion. *J. Neurophysiol.* 105, 2260-2274.
- Purkerson, S.L., Potter, L.T., 1998. Use of antimuscarinic toxins to facilitate studies of striatal muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 707-713.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2004. *Neuroscience*. 3th. Ed.; Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts; pp129-163.
- Redgrave, P., Prescott, T.J., Gurney, K., 1999. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neurosci.* 89, 4, 1009-1023.
- Rowan, E.G., Harvey, A.L., 2011. Snake toxins from mamba venoms: unique tools for the physiologist. *Acta Chim Slov.* 58(4):689-92.
- Salgado, H., Tecuapetla, F., Pérez-Rosello, T., Pérez-Burgos, A., Pérez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., 2005. A reconfiguration of Ca_v2 Ca²⁺ channel current and its dopaminergic D₂ modulation in developing neostriatal neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 3771-3787.
- Santiago, M.P., Potter, L.P., 2001. Biotinylated m4-toxin demonstrates more M₄ muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Res.* 894,12-20.
- Scarr, E., 2012. *Muscarinic Receptors: Their Roles in Disorders of the Central Nervous System and Potential as Therapeutic Targets.* *CNS Neurosci Ther.* 18(5):369-79.

- Schwartz, J.H., Javitch, J.A., 2013. In Principles of neural science; 5th ed.; Kandel, E., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S., Hudspet, A.J., Eds.; McGraw-Hill: New York, p 289-305.
- Servent, D., Blanchet, G., Mourier, G., Marquer, C., Marcon, E., Fruchart-Gaillard, C., 2011. Muscarinic toxins. *Toxicon*. 58(6-7):455-63.
- Servent, D., Fruchart-Gaillard, C., 2009. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem*. 109(5):1193-202.
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N.M., Surmeier, D.J., 2007. Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 1458-1466.
- Shirey, J.K., Xiang, Z., Orton, D., Brady, A.E., Johnson, K.A., Williams, R., Ayala, J.E., Rodriguez, A.L., Wess, J., Weaver, D., Niswender, C.M., Conn, P.J., 2008. An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. *Nat Chem Biol*. 4(1):42-50.
- Shultz, W., 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259-288.
- Simms, B. A., Zamponi, G.W., 2014. Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *Neuron*. 82(1):24-45.
- Sizemore, R.J., Reynolds, J.N., Oorschot, D.E., 2010. Number and type of synapses on the distal dendrite of a rat striatal cholinergic interneuron: a quantitative, ultrastructural study. *J. Anat.* 217, 223-235.
- Skibinski, G., Finkbeiner, S., 2011. Drug discovery in Parkinson's disease: update and developments in the use of cellular models. *Int J High Throughput Screen* 2011; 2011: 15–25.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci.* 86, 353-387.

- Stoof, J.C., Keabian, J.W., 1981. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*. 294, 366-8.
- Suh, B.C., Hille, B., 2005. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* 15:370-378.
- Suh, B.C., Hille, B., 2008. PIP2 Is a necessary cofactor for ion channel function: How and Why? *Annu Rev Biophys* 37:175-195.
- Surmeier, D.J., Seno, N., Kitai, S.T., 1994. Acutely isolated neurons of the rat globus pallidus exhibit four types of high-voltage-activated Ca²⁺ current. *J. Neurophysiol.* 71, 1272-1280.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C. Jr, Nairn, A.C., Greengard, P., 1995. Modulation of calcium currents by a D₁ dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385-397.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3-18.
- Takakusaki, K., 2013. Neurophysiology of gait: from the spinal cord to the frontal lobe. *Mov. Disord.* 28,1483-1491.
- Takakusaki, K., Habaguchi, T., Ohtinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., Sakamoto, T., 2003. Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neurosci* 119:293-308.
- Takakusaki, K., Oohinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., Habaguchi, T., 2004. Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Prog Brain Res* 143:231-237.
- Tedford, H.W., Zamponi, G.W., 2006. Direct G protein modulation of Ca_v2 calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 58, 837-862.
- Tepper, J.M., Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685-692.

- Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Kóos, T., Ibañez-Sandoval, O., 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy*.
- Thomas, B., Beal, F., 2007. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 16:R183–R194.
- Threlfell, S., Cragg, S.J. 2011. Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. *Front. Syst. Neurosci*. 5, 11.
- Tritsch, N.X., Sabatini, B.L., 2012. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76, 33-50.
- Valjent, E., Bertran-González, J., Hervé, D., Fisone, G., Girault, J.A., 2009. Looking BAC at striatal signalling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci*; 32, 538-547.
- Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 24, 125-32.
- Vautrelle, N., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., In *Cortico-Subcortical dynamics in Parkinson's Disease*; Tseng, K.-Y., Ed.; Humana Press: New York, 2009, p 73-86.
- Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, J.A., Guzmán, J.N., Galarraga, E., Surmeier, D.J., Bargas, J., 2003. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol*; 553:169-182.
- Vilchis, C., Bargas, J., Ayala, G.X., Galván, E., Galarraga, E., 2000. Ca^{2+} channels that activate Ca^{2+} -dependent K^+ currents in neostriatal neurons. *Neurosci*. 95,745-752.
- Vivas, O., Arenas, I., García, D.E., 2012. Voltage-independent inhibition of $Ca_v2.2$ channels is delimited to a specific region of the membrane potential in rat SCG neurons. *Acta. Biochim. Biophys. Sin*. 44, 544-549.
- Vizcarra-Chacón, B.J., Arias-García, M.A., Pérez-Ramirez, M.B., Flores-Barrera, E., Tapia, D., Drucker-Colin, R., Bargas, J., Galarraga, E., 2013. Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci*. 14, 60.

- Wadel, K., Neher, E., Sakaba, T., 2007. The coupling between synaptic vesicles and Ca^{2+} channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron* 53, 563–575.
- Wheeler, D.B., Randall, A., Tsien, R.W. 1994. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107–111.
- Wichmann, T., DeLong, M.R., 2003. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 991:199-213.
- Wichmann, T., DeLong, M.R., 2013. In *Principles of neural science*; 5th ed.; Kandel, E., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S., Hudspet, A.J., Eds.; McGraw-Hill: New York, p 982-998.
- Wilson, C.J., 1993. The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res*; 99:277-97. Review.
- Wilson, C.J., 2004. Basal Ganglia. In: *The Synaptic Organization of the Brain* (Shepard GM, ed), pp 361-414. Oxford: Oxford University Press.
- Wilson, C.J., Groves, P.M., 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.
- Xiang, Z., Thompson, A.D., Brogan, J.T., Schulte, M.L., Melancon, B.J., Mi, D., Lewis, L.M., Zou, B., Yang, L., Morrison, R., Santomango, T., Byers, F., Brewer, K., Aldrich, J.S., Yu, H., Dawson, E.S., Li, M., McManus, O., Jones, C.K., Daniels, J.S., Hopkins, C.R., Xie, X.S., Conn, P.J., Weaver, C.D., Lindsley, C.W., 2011. The Discovery and Characterization of ML218: A Novel, Centrally Active T-Type Calcium Channel Inhibitor with Robust Effects in STN Neurons and in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2(12):730-742.
- Yan, Z., Flores-Hernández, J., Surmeier, D.J., 2001. Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103, 1017-1024.

- Yan, Z., Surmeier, D.J., 1996. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca^{2+} currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane delimited, G-protein pathway. *J. Neurosci.* 16, 2592-2604.
- Yasuda, R.P., Ciesla, W., Flores, L.R., Wall, S.J., Li, M., Satkus, S.A., Weisstein, J.S., Spagnola, B.V., Wolfe, B.B., 1993. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol pharmacol.* 43: 149-157.
- Zhou, F.M., Wilson, C.J., Dani, J.A., 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol. Rev.* 53, 590-605.

8. ANEXO 1

Neuropharmacology 85 (2017) 333–344



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm



Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M₄-type receptors



Teresa Hernández-Hores, Omar Hernández-González, María H. Pérez-Ramírez, Esther Lara-González, Mario A. Arias-García, Mariana Duhne, Azucena Pérez-Burgos, G. Aleph Prieto, Alejandra Figueroa, Elvira Galarraga, José Vargas*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, PO Box 70 347, México City, DF 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 July 2014
Received in revised form
12 September 2014
Accepted 23 September 2014
Available online 1 October 2014

Keywords:
Acetylcholine
Serotonin
Striatal projection neurons
Dorsolateral
Ca²⁺/Ca²⁺ channels

ABSTRACT

Models of basal ganglia (BG) function predict dynamic interactions between two classes of striatal projection neurons (SPNs): direct pathway neurons (dSPNs) that facilitate movements and indirect pathway neurons (iSPNs) that repress movement execution. Two main modulatory transmitters regulate the output of these neurons: dopamine (DA) and acetylcholine (ACh). dSPNs express D₁-type D₁, M₁- and M₂-type ACh receptors, while iSPNs express D₂-type D₂ and M₄-type ACh receptors. Actions of M₁-, D₁- and D₂-receptors have been extensively reported, but we still ignore most actions of muscarinic M₄-type receptors. Here, we used whole-cell recordings in acutely dissociated neurons, pharmacological tools such as muscimol, and BSC D₁ receptor-GFP transgenic mice to show that activation of M₄-type receptors with bath-applied muscarine enhances Ca²⁺ currents through Ca_v1 channels in dSPNs and not in iSPNs. This action increases excitability of dSPNs after both direct current injection and synaptically driven stimulation. The increase in Ca²⁺ current and excitability were blocked specifically by mamba toxin-3, suggesting mediation via M₄-type receptors. M₄-receptor activation also increased network activity of dSPNs but not of iSPNs as seen with calcium-imaging techniques. Moreover, actions of D₁-type and M₄-type receptors may add to produce a larger enhancement of excitability of dSPNs or, paradoxically, oppose each other depending on the order of their activation. Possible implications of these findings are discussed.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The basal ganglia (BG) are thought to select motor actions, participate in cognitive and procedural memory (Gerfen and Surmeier, 2011). A model of the BG proposes that direct pathway striatal projection neurons (dSPNs) facilitate movement whereas indirect pathway projection neurons (iSPNs) repress movement (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Kravitz et al., 2010). BG are regulated by two modulatory transmitters whose higher brain concentrations are in the striatum (Lorant et al., 1996; Prensa and Parent, 2001; Shultz, 2007; Zhou et al., 2002): dopamine (DA) and acetylcholine (ACh). dSPNs express D₁-type D₁ receptors that increase their excitability in part by enhancing Ca²⁺ current through Ca_v1 channels (Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997; Surmeier et al., 2011; Trisch and Sahana, 2012), while iSPNs

express D₂-type D₂ receptors that decrease their excitability in part by reducing the same Ca²⁺ current (Hernández-López et al., 2000; Salgado et al., 2005). Both dSPNs and iSPNs express M₁-type ACh receptors that increase neuronal excitability in part by depressing K⁺ currents directly or indirectly and by enhancing persistent Na⁺ currents (Galarraga et al., 1998; Carrillo-Reid et al., 2009b; Goldberg et al., 2012; Perez-Rosello et al., 2006; Shen et al., 2005, 2007; Valdez et al., 2002). M₄-type receptors modulate high voltage activated (HVA) calcium currents involved in activating Ca²⁺-dependent K⁺ currents, firing patterns and regulating transmitter release (Dolezal and Turek, 1999; Galarraga et al., 1999; Howe and Surmeier, 1995; Perez-Burgos et al., 2008, 2010; Perez-Rosello et al., 2005).

The actions of M₄-type receptors have been extensively explored. However, we do not know much about muscarinic M₄-type receptors, preferentially expressed in dSPNs (Goldberg et al., 2012; Ince and Gilix, 1997; Santiago and Potter, 2001; Wu et al., 2001).

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 9573.
E-mail address: jrgalarraga@icfsc.unam.mx (J. Vargas).

responses with or without the firing of repetitive action potentials (Florez-Ramirez et al., 2010). The stimuli were produced by the program but controlled by an isolator unit (Diplomat Ltd, England). The membrane potential was held at about -70 mV near the slow-wave resting membrane potential (-61 ± 5 mV; $n = 30$) while postsynaptic conductance responses, being hundreds of millisecond (Florez-Ramirez et al., 2010, 2011; Vivas-Chandín et al., 2011), were induced.

2.6. Calcium imaging

In this study, BAC D₂-eGFP transgenic mice were anesthetized in decubitus prone and surgically perfused with an ice-cold solution containing (in mM): 234 mL, 2.5 NaCl, 7 MgCl₂, 0.4 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1.45 NaH₂PO₄, 7 glucose, butyrate 0.1 and 4.5 g/mole (pH = 7.4) in 100% O₂ saturated with 95% O₂–5% CO₂ before dissection. Slices were then obtained with the same procedure as above.

Slices were incubated at 34 °C in the dye for 40 min with 6 μ M calcium orange AM (Cal-RCO-5, Invitrogen, Life Technologies) and equilibrated with 95% O₂–5% CO₂. Slices were then superfused with an ice-cold solution of room temperature until 25 °C in a chamber heated on the stage of an upright microscope equipped with a 20 \times water-immersion objective (Olympus XM100, Olympus America Inc., Baltimore, MD, USA) and perfused with a perfusion chamber (Stuart Instruments, Nevada, US).

Images were acquired with a cooled light camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific, Tucson, AZ) at 100–250 ms/frame. Acquisition software was also designed in the LabVIEW environment. The signal level was 100 \times 800 (x, y) in 5000 rows \times 1000 rows (30 ms exposure) were taken at different pharmacologic conditions. The same program performed preliminary image processing.

All action currents in a field were automatically identified and their mean histograms was measured as a function of time. Single pixel traces were discarded using a 5 pixel-wide area filter. Cell membrane potential fluctuations signals were computed as $\Delta F/F$ with a 10 Hz low-pass cut-off frequency at any frame and for a resting fluorescence. Cell membrane potential fluctuations were detected based on a threshold value given by the first time derivative of their colour time-course (Liu et al., 2006; Castillo-Rodriguez et al., 2010).

2.7. Atomic force images

For dissociated neurons drugs were applied with a gravity fed system that produces a glass capillary with 100 μ m inner diameter rigid in the direction of superfusion. Flow solution changes were performed with a D.C. controlled microvalve system (Lee, Texas, U.S.A.). This method allowed reversible drug applications (Perez-Rosello et al., 2005). The current ramp and calcium imaging recording drugs were administered into the bath volume. Substances used were

added to the superfusion from heated stock solutions. TTX was obtained from Alomone Laboratories (Cat #500, Israel, Israel). Muscimol, bicuculline, muscimol (100 nM and 1 μ M) and NBQX were obtained from Napidex International, Ltd. NBQX-4-010 and the #PMT-0500s, Louisville, KY, USA. Nicotinic, muscimol and SRX-129C were obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. SRX-129C and Cat #5179 (1–500 μ g/ml; St. Louis, MO, USA). Most active substances were dissolved in water except stock solutions were added to the superfusion to give the final concentration. NBQX solution was prepared in 400 μ M, in which case control saline also contained HC at the same final concentration. Stock solution were never older than a week.

2.8. Data analysis

Digitalized data were imported to analysis and plotting into commercial software (Origin 5, Microcal, Northampton, MA, USA; IDO: nr_000019). Representative mean \pm SEM of post hoc comparisons (Bonferroni) are here reported as Ca^{2+} currents and group comparisons using sampling, such as unpaired t-test or unpaired Student's t-test or one-way or two-way ANOVA plus post hoc Bonferroni tests were usually used upon repeated measurements (Steel, H., BRD, Inc, 1974) and Graphpad from 5.8013 (nr_000001) San Jose, CA, USA). Three small examples distribution statistics were also performed to detect areas significant differences in Kruskal–Wallis ANOVA tests with post hoc Dunnett's or Tukey's tests or Mann–Whitney test depending on paired or not paired samples when comparing several treatments. $P < 0.05$ was used as significant threshold.

3. Results

3.1. Activation of muscimol M_2 -type receptors enhances Ca^{2+} current in acutely dissociated direct pathway striatal neurons

Striatal projection neurons (SPNs) express muscimol M_2 - and M_4 -type ACh receptors. Several actions of M_2 -type receptors have been previously reported by this and other laboratories (e.g., Perez-Burgos et al., 2006, 2010; Perez-Rosello et al., 2005; Shen et al., 2005–2007); most importantly M_2 -type receptors increase the excitability of the cell bodies of SPNs by decreasing potassium currents directly or indirectly by decreasing the Ca^{2+} currents that activate them (Perez-Rosello et al., 2006; Vichis et al., 2000). With the help

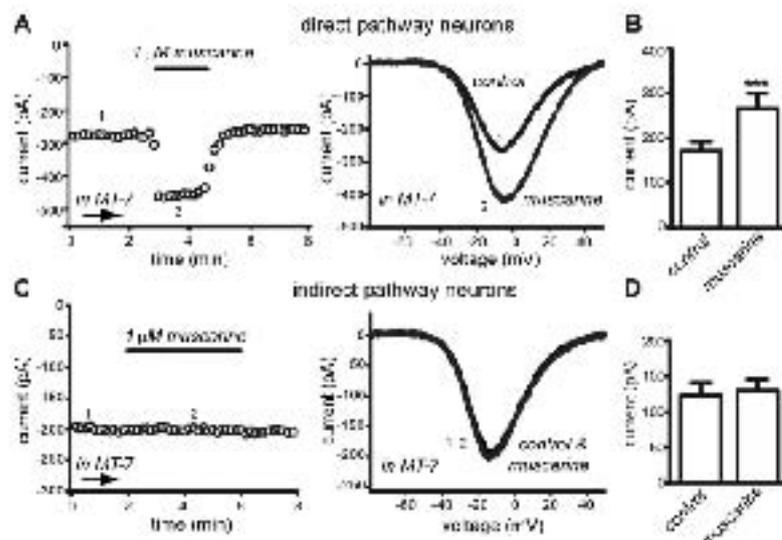


Fig. 2. Muscimol modulate Ca^{2+} currents in direct striatal projection neurons when M_2 -type receptors are blocked. A) 50 nM NBQX was present to block muscimol M_4 -type receptors during the muscimol effects only on the M_2 -type receptors. Time courses of Ca^{2+} current amplitude showed that addition of 1 μ M muscimol enhanced Ca^{2+} current in direct pathway striatal projection neurons (SPNs) taken from BAC D₂-eGFP mice. The right panel shows representative I–V plots obtained at different moments during the experiment as indicated by numbers in the first course. B) The amplitude of the Ca^{2+} current was significantly enhanced ($p < 0.001$, Student's t-test). C) Time course of a similar experiment in indirect pathway projection neurons (SPNs) taken from BAC D₂-eGFP mice showing that muscimol does not modulate Ca^{2+} current when M_2 -type receptors are blocked by NBQX, suggesting that SPNs do not express M_2 -type receptors. Right panel: representative I–V plots indicated by numbers in the first course. D) There was no significant action of muscimol on Ca^{2+} current recordings from any SPNs except ($p > 0$; Student's t-test).

3.2. Activation of M_2 -type muscarinic receptors enhances current through Ca_v1 -channels

To begin to elucidate the mechanism of M_2 receptor action we wanted to know which component of Ca^{2+} current was being modulated (Teggs et al., 1994). We tested the dihydropyridine antagonist, nifedipine (5 μ M), to see what the Ca_v1 -channels were the blocked channels. Fig. 4A shows the time course of Ca^{2+} -current amplitude in the presence of MT-7. Nifedipine blocked a part of the Ca^{2+} -current (Fargas et al., 1994; Salgado et al., 2005). Namely, when Ca_v1 -channels were blocked, M_2 -receptors activation had no significant actions in dSPNs (Fig. 4B). Representative I–V plots are depicted in Fig. 4B. The same result was obtained in a sample of dSPNs (Fig. 4C; $n = 6$; NS, Student's *t*-test).

The fact that M_2 -type receptors acted on Ca_v1 -channels pointed towards an action that is not membrane delimited (Xing et al., 2008; Dolzai and Tuck, 1999; Tedford and Zamponi, 2000; Vivas et al., 2012; Yan and Summeier, 1995). To confirm this inference and to obtain any sign of another channel intervention (e.g., Ca_v2 -channels) we employed BAPTA-1-GFP dissociated neurons to observe the action of muscarine under the prepulse facilitation/relief protocol (Fig. 4D). It can be observed that, after removing constitutive G-protein modulation, the absolute magnitude of current change after muscarine (1 μ M) was not significantly different before than after the conditioning prepulse to 80 mV (Fig. 4E, F; $n = 6$; NS). This result suggests that M_2 -type modulation of Ca_v1 -channels is not membrane delimited or voltage-dependent. The signaling cascade used by M_2 -type

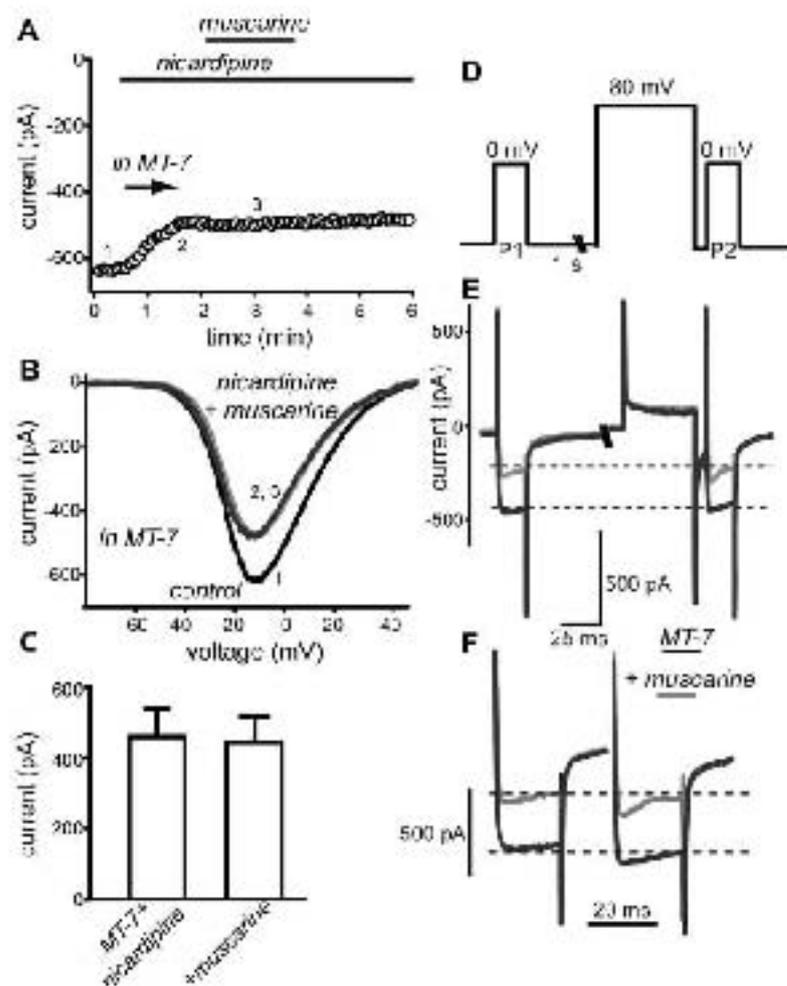


Fig. 4. Ca^{2+} -current modulation by M_2 -receptors activation mediated by Ca_v1 -channels. dSPNs were recorded, first, that Ca^{2+} -current in dSPNs was enhanced by 100 pA (1 μ M) with a Ca_v1 -channel antagonist (nifedipine) treatment (as indicated the time of drug application), and second, that once Ca_v1 -channels are blocked, the action of 1 μ M muscarine on the Ca^{2+} -current of dSPNs was abolished. A1–C' plots taken from different experiments during the time course as indicated by numbers. MT-7 was present during the entire experiment. C1 Muscarine had no significant action on Ca^{2+} current. Both M_2 -receptors and Ca_v1 -channels were blocked in dSPNs ($n = 6$; NS, Student's *t*-test). B' Potential of voltage clamp with (control protocol) and to test the voltage dependence of M_2 -receptor mediated modulation. C' Ca^{2+} -current evoked by the presence of C1 before (black trace) and after muscarine application (gray trace). Note that conditioning prepulse to 80 mV changed the kinetics and amplitude of Ca^{2+} current suggesting constitutive G-protein action. However, muscarine modulation was the same before and after the conditioning depolarization, suggesting that the M_2 -receptor mediated action is not membrane delimited. Consistent with Ca_v1 -channel modulation ($n = 6$; NS, Student's *t*-test). F' Amplification of traces in E' before and after the conditioning prepulse to better assess modulation.

receptors to increase current through Ca_v1 -channels is out of the scope of the present study.

3.3. Enhancement of Ca_v1 -channels current by M_4 -receptors induces an enhancement of excitability in direct pathway neurons

It has been reported that an enhancement of Ca^{2+} current carried by Ca_v1 -channels facilitates stimulus evoked depolarization increasing the firing of action potentials in SPNs (Hernández-López et al., 1997; Pérez-García et al., 2003). This action is preferentially observed at depolarized membrane potentials (e.g., -60 mV; near the "up"-state) where the participation of some K^+ -currents is decreased by inactivation (Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997; Rosenbaum et al., 1996; Pérez-García et al., 2003). To see whether M_4 receptors increase in Ca_v1 channels current induces enough depolarization to increase excitability, experiments in Fig. 5 used the whole-cell configuration in brain slices to record dSPNs and ISPNs from BAC D α -GFP and BAC D β -GFP neurons, respectively, during current-clamp. From top to bottom, Fig. 5A and B shows responses to depolarizing current steps (top) from a holding potential of about -60 mV (Hernández-López et al., 1997, 2000). Controls were designed to evoke an equal number of action potentials in both dSPNs and ISPNs (Fig. 5A, B control). In these conditions, addition of MT-7 to block M_2 -type receptors did not have any significant consequence (Fig. 5A, B –MT-7 NS), suggesting a lack of constitutive activation of M_2 -type receptors in these conditions. Thereafter, when M_4 -type receptors were the only muscarinic receptors available in SPNs, addition of $1 \mu\text{M}$ muscarine augmented the number of evoked action potentials in dSPNs but not in ISPNs (Fig. 5A, B +muscarine). This result shows that previously reported muscarinic facilitatory actions in ISPNs are only due to M_2 -receptors (see: Galarraga et al., 1999; Pérez-Rosello et al., 2006). However, facilitatory actions on dSPNs are due to both M_2 - and M_4 -type receptors (Galarraga et al., 1999; Pérez-Rosello et al., 2006). The subsequent administration of $5 \mu\text{M}$ nicardipine lowered the number of action potentials in both neuron classes, since Ca_v1 -channels are expressed in all SPNs (Salgado et al., 2006). In addition, blockade by nicardipine of the firing increase observed in dSPNs demonstrates that Ca_v1 are responsible of M_4 -receptor actions (Pérez-García et al., 2003). Graph in Fig. 5C summarizes the results of a sample of neurons recorded from both classes of BAC mice: activation of M_4 -receptors significantly enhanced frequency discharge (mean \pm SEM) in dSPNs ($n = 6$; $F_{2,15} = 24.3$, $***P < 0.001$; two way ANOVA with post hoc Bonferroni test $***P < 0.001$). A Friedman ANOVA test was also significant: $F = 0.02$). On the other hand, muscarine had no significant actions on ISPNs discharge (Fig. 5C $n = 6$ NS). Muscarinic action was significantly different between dSPNs and ISPNs ($n = 12$; $***P = 0.002$; Kruskal–Wallis ANOVA). As expected, the use of 50 nM MT-7 instead of nicardipine also blocked the firing increase elicited by M_4 receptor activation (not illustrated). To conclude, increase in Ca_v1 current due to M_4 receptors can increase the firing of dSPNs upon direct current injection. Next we wanted to see if firing facilitation induced by M_4 -receptors can also be observed during synaptic stimulation.

It is known that SPNs receive polysynaptic and convergent inputs from the cortex and striatum after a single suprathreshold stimulus delivered in the cortex (Viciana-Chacón et al., 2013). These synaptic responses activate dSPNs, EPNs, cholinergic and other interneurons during a time span of several hundred milliseconds (Flores-Barrera et al., 2010; Viciana-Chacón et al., 2013). In addition, nominally corticostriatal responses in dSPNs greatly differ from those exhibited by ISPNs, dSPNs responses last longer and fire more action potentials (Añón-García et al., 2013; Flores-Barrera et al., 2010; Viciana-Chacón et al., 2013). Thus, a first goal in the following experiments was to observe whether G-protein mediated

muscarinic signaling is fast enough to intervene in the regulation of suprathreshold synaptic responses in SPNs. A second goal was to observe if this modulation is in part mediated by M_4 -type receptors.

Fig. 6A and B shows that synaptically driven responses last enough to detect modulatory inputs driven by G-protein signaling from muscarinic receptors (Añón-García et al., 2013; Pérez-Burgos

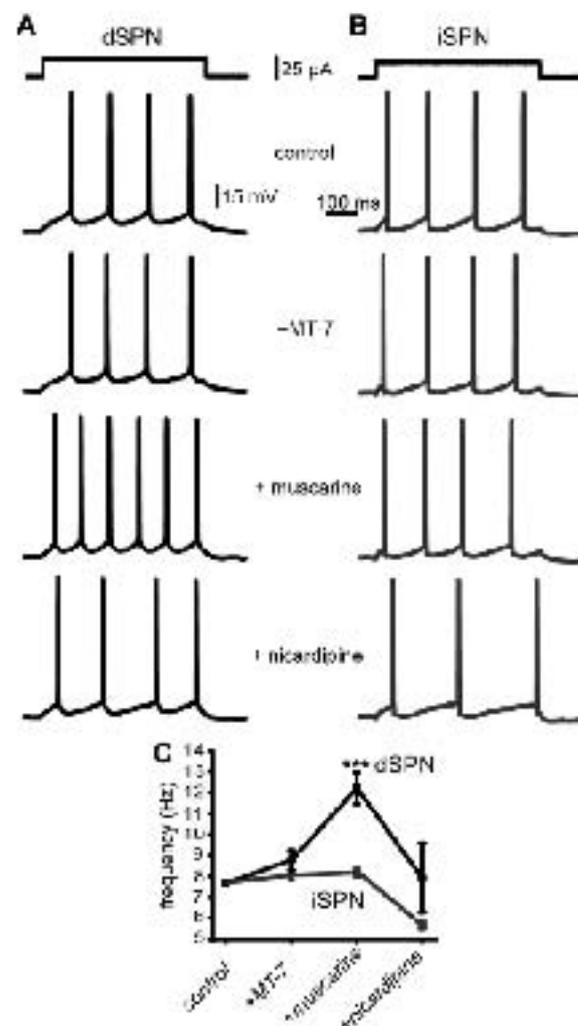


Fig. 5. M_4 -receptor enhancement of Ca_v1 -current carried by Ca_v1 -channels increased the excitability of direct pathway neurons. A, B) From top to bottom, depolarizing current stimuli evoked the firing of action potentials in both dSPNs (A) and ISPNs (B). Control conditions were chosen to obtain the same number of action potentials in both neurons (control). Then, 50 nM MT-7 was added to block M_2 -type receptors (-MT-7). This treatment did not change firing frequency. The next, $1 \mu\text{M}$ muscarine was added to the both cases (+muscarine). Note that muscarine increases or increases in frequency in dSPNs ($n = 6$) but not in ISPNs ($n = 6$). Subsequent by Ca_v1 -channels were blocked by $5 \mu\text{M}$ nicardipine (+nicardipine). Nicardipine reduced the firing rate in both cases of SPNs since both express Ca_v1 -channels (Pérez-García et al., 2003). This result shows that blockade of Ca_v1 -channels abolished the action of M_4 -receptors on the firing rate. C) Shows the mean firing frequency in some experimental conditions of both dSPNs (black line) and ISPNs (grey line) identified from B) and D α -GFP mice genetic mice. Differences were significant: $n = 6$; $F_{2,15} = 24.3$, $***P < 0.001$; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test $***P < 0.001$. Kruskal–Wallis test was significantly different between dSPNs and ISPNs ($n = 12$; $***P = 0.002$; Kruskal–Wallis ANOVA).

et al., 2008, 2010; Shen et al., 2006). In fact, blocking M_1 -type receptors in neurons from 5α -D β and U_2 eLAP mice disclosed the actions of endogenous acetylcholine (Galarraga et al., 1998), which is that of sustaining synaptic depolarization in order to fire trains of action potentials (Fig. 6A and B; black traces are control responses and gray traces are responses after MT-7). Because we did not detect the action of endogenous acetylcholine after direct current

injection (Fig. 5 above), it is inferred that muscarinic influence during synaptic responses is due to nominally cortical activation of cholinergic interneurons (Galarraga et al., 1998; Vaccarà-Libroni et al., 2013).

In both dSPNs ($n = 6$) and iSPNs ($n = 7$) digital subtractions of recordings in the presence of MT-7 from control recordings (traces at the bottom of recordings before and during MT-7) show that M_1 -

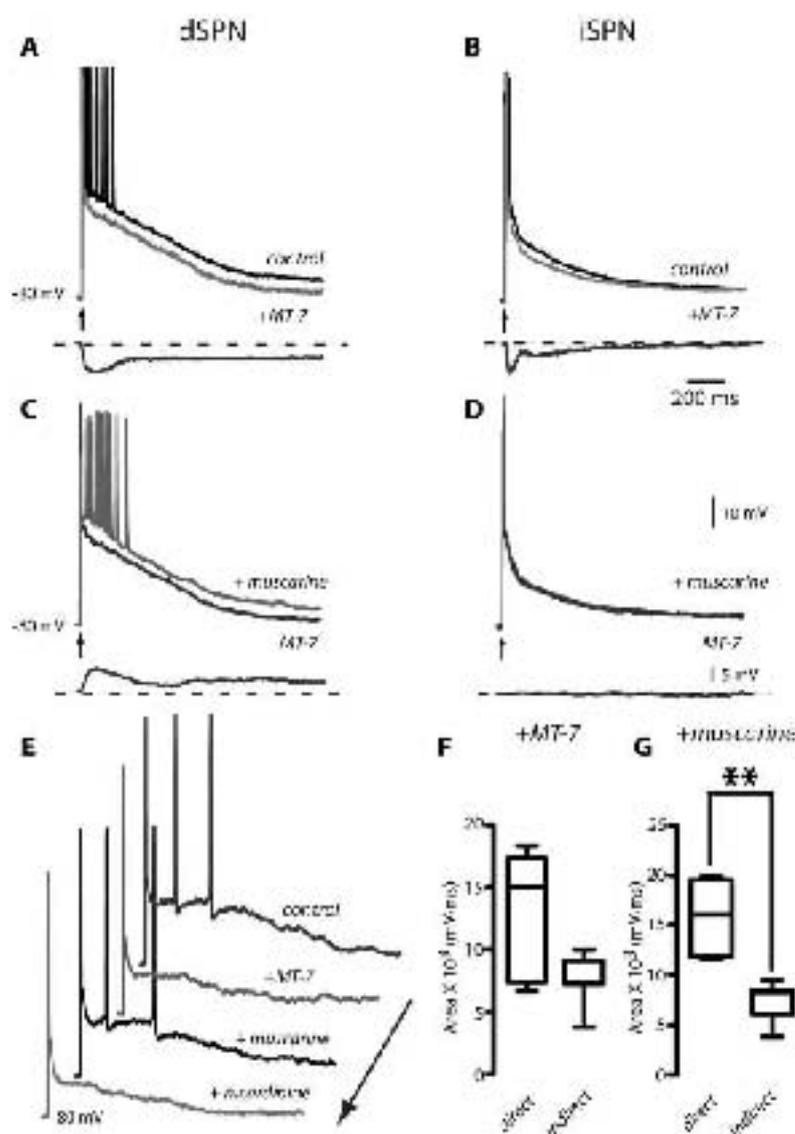


Fig. 6. Membrane responses can be seen as suprathreshold membrane potential responses of cortical projection neurons. A, E) Typical suprathreshold responses of dSPNs (A, $n = 6$) and iSPNs (E, $n = 7$) illustrating their main differences (Data: Barona et al., 2010). Each trace are the controls. Addition of M_1 -receptor antagonist, 50 nM MT-7, significantly reduced the suprathreshold responses in both neuron classes (gray traces, $^{***}P < 0.0001$, ANOVA with post hoc Bonferroni test for two), demonstrating that postsynaptically activated responses include a component from cholinergic origin. Bottom traces in A and B are digital subtractions showing that MT-7 hyperpolarized the responses along their decay (see also C, D). In the continuous presence of MT-7, 1 μ M muscarinic was added to the experiments. Note that only dSPNs partially recovered their firing of action potentials. Digital subtractions at the bottom show that muscarinic depolarized dSPNs but not iSPNs (E). Recordings of a control neuron (dSPN) in labeling a separate set of neurons (see text). Being in control it related to MT-7 (it is restored by muscarinic and it is again blocked by arecoline). F) Histograms illustrate the total area under the responses during MT-7 (ANOVA, $F_{2,11} = 26.1$, $^{***}P < 0.0001$ with post hoc Bonferroni test, $^{***}P < 0.001$). In contrast, when MT-7 was added, muscarinic is essential for increasing the area under the responses (this point only in dSPNs) ($F_{2,11} = 24.5$, $^{***}P < 0.0001$, ANOVA with post hoc Bonferroni test, $^{***}P < 0.001$).

single cell resolution (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a; 2011; Jádár et al., 2010; Plata et al., 2013).

We previously described that one facilitatory action of M_2 -type receptors is due to inward persistent sodium currents (Carrillo-Reid et al., 2008b). Therefore, now we wanted to see whether inward currents carried by Ca_v1 -channels can also induce a facilitatory action on the network even with M_2 -receptors blocked. In each raster plot in Fig. 7A and B the y-axis indicates the number of neurons being imaged; each row denotes the activity of a single neuron (Carrillo-Reid et al., 2008). The raster plot in Fig. 7A shows the spontaneous activity of a group of GFP+ neurons (dSPNs, red marks). The histogram at the bottom shows spontaneous and significant events ('peaks' of neuronal inactivation (left panel; significant peaks of correlated firing in red). Upon addition of 50 nM MT-7 to the bath saline neuronal activity was decreased and peaks of coactive cells became absent (middle panel), consistent with a loss of muscarinic tone (due to endogenous acetylcholine) present during on-going microcircuit activity (Carrillo-Reid et al., 2009a). Finally, the right panel shows the action of muscarine (1 μ M) added in the continuous presence of MT-7; note that activity was greatly recovered and that peaks of coactive cells re-appeared (histogram at the bottom). This action was blocked by MT-3 in two experiments (not illustrated).

Fig. 7B shows a similar raster plot illustrating the spontaneous activity of GFP- neurons (blue marks) taken from the same slice from a BAC D_1 -eGFP mouse. Control activity in the left panel exhibits significant peaks of coactive cells (blue peaks). The middle panel shows that blockade of M_2 -receptors decreased this activity as in GFP+ cells. But when muscarine was added in the continuous presence of MT-7 (right panel), the activity was not recovered in GFP- cells. Because these experiments were done in slices from BAC D_1 -eGFP mice it is logical to infer that most GFP- cells are ISPNs (although some interneurons may also be present).

Graph in Fig. 7C shows mean \pm SEM of neurons active per minute after pooling all active cells from 4 slices taken from different animals ($n = 88$ GFP+ neurons – red plot and $n = 110$ GFP- neurons – green plot). The average activity per minute of GFP+ and GFP- neurons was not significantly different in control conditions, and it was significantly decreased in both neuronal populations after addition of 50 nM MT-7 to the bath saline ($***P < 0.001$ as compared to their respective controls; ANOVA with post-hoc Bonferroni test), suggesting that muscarinic M_2 -receptors sense endogenous acetylcholine tone during normal microcircuit activity. Nevertheless, a divergence was found when 1 μ M muscarine was added to the superfusion in the continuous presence of MT-7: only GFP- neurons restored their activity to the previous level, before adding MT-7 ($**P = 0.002$; ANOVA with post-hoc Bonferroni test). In fact, GFP- neurons did not change their activity significantly as compared to that obtained with the MT-7 treatment. Neuronal activity was significantly different in MT-7 plus muscarine in GFP- as compared to GFP+ neurons ($P = 0.001$; Student's *t* test with Bonferroni adjustment and Mann-Whitney *U* test). These results indicate that actions of M_2 -receptors seen in most neurons recorded in isolation, in slices, are still predominant during circuitry on-going activity and are not the result of focusing on single cells (see Carrillo-Reid et al., 2011).

To summarize, a consistent result was obtained for the action of muscarinic M_2 -type receptors in dissociated neurons, in direct evoked firing after current injection in synaptically evoked firing from the cortex and in neurons firing during microcircuit function: M_2 -receptor activation increased the activity of dSPNs during M_2 -receptor blockade but it does not increase the activity of ISPNs in the same conditions. Apparently, M_2 -receptors are exclusive activators of the direct pathway in these conditions. Because M_2 -receptors actions appeared to come from Ca_v1 -current enhancement

and because D_1 dopamine receptors also modulate this current expressed in the same dSPNs, we considered important to find out which kind of possible interaction may exist between M_2 and D_1 receptors.

3.5. Interactions between muscarinic M_2 and dopaminergic D_1 receptors

dSPNs co-express both dopaminergic D_1 and cholinergic M_2 receptors (Ince and Gilan, 1957; Jeon et al., 2010). The present results have shown that muscarinic M_2 -receptors enhance the current mediated by Ca_v1 -channels and thus increase the excitability of dSPNs. Previous work demonstrated that activation of dopamine D_1 -receptors performs a similar set of actions by increasing membrane current through the same channels (Dargatzis et al., 1994; Flores-Barrera et al., 2011; Galarraga et al., 1997; Hernández-López et al., 1997; Sarmuier et al., 1995). Therefore, our next question was to ask whether these actions are produced by signaling mechanisms that add or obstruct each other and if possible interactions may depend on the order of receptors activation.

dSPNs obtained from BAC D_1 -eGFP mice were stimulated with direct depolarizing current injections to evoke the firing of action potentials from a -63 mV holding potential (cf. Fig. 5 with D.C. current, at bottom) and during the continuous blockade of M_2 -type receptors with 50 nM MT-7 (Fig. 8). From top to bottom, voltage traces in Fig. 8A and B illustrate the firing of dSPNs. First, in the presence of MT-7, secondly, in the presence of either muscarine (1 μ M) to activate M_2 -receptors (Fig. 8A middle) or SKF 81297 (10 μ M) to activate D_1 -receptors (Fig. 8B middle). Firing rate increased in both cases. Next, SKF 81297 was added to the cell previously facilitated with muscarine which was superfused continuously (Fig. 8A bottom). Firing rate increased even more demonstrating that facilitation by muscarinic and dopaminergic receptors activation can add together. In contrast, when muscarine was added to the cell previously facilitated with SKF 81297, it decreased the firing rate enhanced by the dopaminergic agonist. That is, muscarinic activation partially reversed dopaminergic modulation when administered in the second place.

We found that the order of application of the agonists predicted whether the first actions were going to be enhanced or reversed by the second agonist. Although Fig. 8A, B shows representative records with a constant current step, Fig. 8C, D illustrate complete intensity–frequency relationships (I–F plots) in each condition. These plots show that when muscarine was added first, dopamine actions were additive in the whole frequency range. In contrast, when muscarine was added in the second place, it decreased the action of a previous dopaminergic modulation. By using the firing rate at the middle of the I–F plots, the graph in Fig. 8E summarizes agonists effects in a sample of dSPN when the muscarinic agonist preceded the dopaminergic one (M_2 - D_1): addition of actions was significant ($n = 9$; ANOVA $F_{2,24} = 90.6$, $***P < 0.0001$ with post-hoc Bonferroni test; $***P = 0.0001$ for muscarine, $***P = 0.0001$ for muscarine plus SKF 81297).

Fig. 8E summarizes a sample of experiments with a changed order of agonists: the increase in firing frequency produced by the dopaminergic agonist SKF 81297 was significant ($n = 8$; ANOVA $F_{2,21} = 13.5$, $***P = 0.0005$, with post-hoc Bonferroni test $***P < 0.05$ for SKF 81297 and for this condition vs. SKF 81297 plus muscarine. Friedman-ANOVA yielded $***P = 0.013$). SKF 81297 plus muscarine were not significantly different when compared to the initial condition. These results are consistent with an inhibition of dopaminergic actions when they are followed by muscarinic actions. Further research is needed to elucidate the signaling details of this complex interaction.

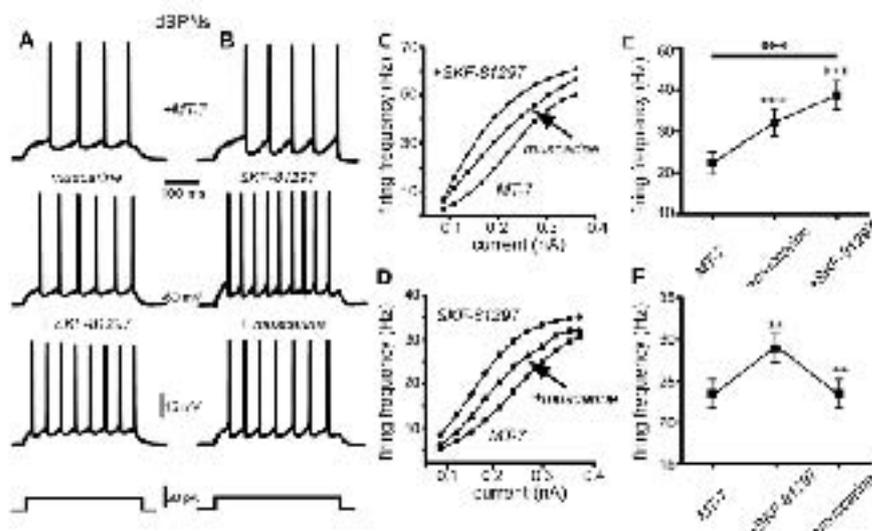


Fig. 8. Interaction of cholinergic and dopaminergic inputs on the level of network activation. **A**, **B** Membrane traces for the firing of two dSPNs from WT ($n=12$) (left) or SKP-81297 ($n=10$) (right). The traces were recorded during the blockade of M₁-receptors with 30 μ M SKF-81297. Note that, 1 μ M muscimol was applied (indicated by an arrow) in the firing rate (muscimol: A, right; B, left). The relative dopaminergic D₂-receptor agonist (+200 nM SKF-81297) was applied, also increasing an increase in the firing rate. The bottom row shows, at 0.1 nA, what happens when SKP-81297 is added during the continuous presence of muscimol and the results are subtracted to the results obtained with muscimol only (right). **C**, **D** Firing frequency (Hz) vs. current (nA) plots for dSPNs under the three conditions in the order: SKF-81297, muscimol and SKF-81297 (representative examples for each condition). **E**, **F** Firing frequency (Hz) vs. current (nA) plots for iSPNs under the three conditions in the order: SKF-81297, muscimol and muscimol. **E**, **F** The graphs are mean \pm SEM. In the order of the graphs of dSPNs: sequential activation of dSPNs (B) and dopaminergic D₂ receptor (C) ($n=9$, ANOVA, $F_{2,18}=306$, $^{***}P<0.001$, $^{***}P<0.001$, $^{***}P<0.001$), muscimol (D) ($n=9$, ANOVA, $F_{2,18}=1000$, $^{***}P<0.001$, $^{***}P<0.001$, $^{***}P<0.001$). **F** Summarizes the behavior of the graph of dSPNs using sequential activation of dopaminergic D₂ receptor (muscimol) ($n=8$, ANOVA, $F_{2,16}=14.5$, $^{***}P<0.0005$), with particular emphasis on the $^{***}P<0.001$ for SKF-81297 and comparing this data with 30 μ M SKF-81297 plus muscimol. $^{***}P<0.001$ were not significantly different to the control condition.

4. Discussion

Dopaminergic and cholinergic muscarinic modulations produce a major importance regulation of neuronal synaptic and microcircuit activity in the striatum (Sussillo et al., 2000; Carrillo-Rodriguez et al., 2009a, 2011; Goldberg et al., 2012; Padoa-Schioppa and Brocci, 2007; Perez-Lopez et al., 2005; Perez-Burgos et al., 2005, 2007; Pisani et al., 2007; Prieto et al., 2009, 2011; Shen et al., 2003, 2007; Surmeier et al., 2001). Because in Parkinson's disease striatal depletion of dopamine runs together with an increase in the tonic concentration of acetylcholine it is customary to think about cholinergic and tholinergic transmissions as "opposite" (Ding et al., 2006) and the controlled circuitry (without disease) as "balanced" (Aosaki et al., 2000; Pisani et al., 2007). Here, we show that opposition is not necessarily the truth. Addition of actions depends on context.

With the help of dSPNs and iSPNs obtained from B6, 3J or 2G-GFP mice (Caden and Surmeier, 2011; Caden and Young, 1989) and very selective muscarinic toxins (Jenkinson et al., 2000; Karlsson et al., 2000) we observed in isolated neurons the actions of muscarinic M₂-type receptors: 1) They enhance Ca²⁺-current carried by Cav1 channels in dSPNs but not in iSPNs; 2) This action increased the excitability and enhanced isolated discharge in dSPNs when firing was either evoked with direct current injections or synaptically; 3) During synaptic activation, muscarinic tonic activation due to endogenous acetylcholine release (Galarraga et al., 1999; Goldberg et al., 2012) was unveiled by the addition of MT-7, a specific antagonist of M₁-receptors; 4) dSPNs were also facilitated by a cholinergic tone during spontaneous microcircuit dynamics as revealed by calcium imaging techniques; addition of MT-7 greatly reduced network activity. Interestingly, microcircuit

activity could be restored exclusively in neurons of the direct pathway by M₁-receptor activation; 5) asymmetric interactions between M₄ and D₁ receptors were additive when the muscarinic agonist preceded the dopaminergic one, and inhibitory when muscarinic activation was initiated after the dopaminergic action.

4.1. Modulation of Cav1-channels by muscarinic M₂-receptors

Among the many electrophysiological actions of dopamine in striatal neurons and circuits (Surmeier et al., 2011; Trusch and Subrini, 2012), the postsynaptic enhancement of Ca²⁺-currents carried by Cav1 channels due to activation of D₁ receptors in dSPNs, and the depression of the same current by activation of D₂-receptors in iSPNs, were among the first described (Jaramillo-Lopez et al., 1997, 2000). These actions have a direct impact on SPNs excitability (Perez-Garcia et al., 2003) and are consistent, at the cellular level, with a basal ganglia model that is highly preserved through vertebrate evolution: dopamine facilitates firing of dSPNs while it depresses firing of iSPNs (Wilson et al., 1994; Carrillo et al., 2010; DeLong, 1990; Ericsson et al., 2013; Kravitz et al., 2010; Oikos et al., 2000). However, this model has not been tested in controversial: while activation or inhibition of dSPNs or iSPNs by dopamine agonists is evident in cell-based studies (Jaramillo-Lopez et al., 1997, 2000), research on more complete preparations frequently finds mixed or inverted responses (Burkhardt et al., 2009; Lang et al., 2005; see Carrillo-Rodriguez et al., 2011 for a possible explanation). Because of this problem the present paper wanted to observe the robustness of M₂-receptors actions in different preparations rather than further explore signaling mechanisms on the same preparation. Perhaps the results now justify signaling as path for further research.

Cholinergic modulation increase excitability and facilitate the firing of both direct and indirect sIFNs (Jalilzadeh et al. 1996; Goldberg et al. 2002; Pissarello et al. 2007). These effects have been attributed to M₁-receptors (Goldberg et al. 2007) and are mediated via a decrease in K⁺-currents density, or by depressing Ca²⁺-currents that activate from (Avram-Garcia et al. 2013). Howe and Sauerbrey 1997; Perez-Hernandez et al. 2008, 2010; Perez-Rosello et al., 2003; Shen et al., 2003, 2007; Vucelja et al. 2000; Howard 2010). This evidence may justify the therapeutic use of anticholinergics in Parkinson's disease (Pagan et al. 2012). The present work shows new evidence validating these findings during synaptically evoked firing and during direct activity. However, due to M₁-type receptors actions in dSPNs, it is perhaps better to use very selective antagonists of M₁-type receptors and not the non-specific anticholinergics.

In fact, we show a novel cholinergic action in dSPNs resulting from the activation of muscarinic M₂-receptors: the enhancement of Ca²⁺-currents via Ca^v channels (see Paratcha and Jones, 2013), which, as stated above, are major voltage-gated channels first shown to be modulated by dopamine receptors (Sauerbrey and Jones et al., 1994; 2002; Sauerbrey et al. 2011).

The actions were induced by the agonist piraricaine in the presence of M₁-receptor blockade with the potent specific antagonist M₁-7 and were blocked by the M₂-receptor antagonist Pict-3 (Bradley, 2009; Juraska et al., 2002; Kazanin et al., 2003; Paratcha and Pyle, 2003). By using both antagonists, M₁-7 and M₂-3, all muscarinic actions were blocked in dSPNs. In addition, dihydropyridines occluded M₂-receptors actions demonstrating that Ca^v-channels are in brain exciters. Although M₂-receptors have been referred to a membrane delimited subpopulation of neurons through their channels by M₂-receptor enhanced excitability to the same stimulus (Perez-Cruz et al. 2007) either with direct current injection, or during synaptic activation that includes dendritic depolarization (Flores-Barrera et al. 2010, 2011). Whether these actions prevail in subjects with Parkinson's disease has to be investigated. But supposing they do, they may explain why the use of non-specific muscarinic antagonists does not exhibit better results. In addition to very selective antagonists of M₁-type receptors, a novel therapeutic hypothesis would include the use of very selective agents for M₂-type receptors. This may help to restore direct pathway function together with dopamine agonists (see below). The role these hypotheses both animal models of Parkinson's disease and novel allosteric ligands (Dwyer et al., 2010) should be tried.

A "functional antagonism" between M₁-type receptors that increase excitability and M₂-type receptors that decrease excitability in SPNs has been observed. M₂-type receptors stand at a distance from cholinergic interneurons and presynaptically inhibit glutamate release from corticostriatal synapses (Hernandez-Fernandez et al., 1994; Salazar et al., 1999; Hong et al., 2010, 2010; Hwang et al., 2009; Palacios and Erazo, 2007). Therefore, a not specific antagonist of muscarinic receptors that blockade by blocking M₂-type receptors would increase such release from interneurons and glutamate release from corticostriatal connections supporting dSPNs excitation. These actions would represent possible functional action of blocking M₂-type receptors.

Nevertheless, this "functional antagonism" between M₁- and M₂-type receptors is valid for both dLNs and dLN (Dwyer et al., 2010). Therefore, a specific agents for M₂-type receptors, by targeting only the direct pathway, would bypass this problem.

In summary, responses to normally cortical stimulation suggest that cholinergic interneurons participate in corticostriatal postsynaptic activity (Feng et al., 2007, 2010; Palacios and Perez-Rosello 2007; Vicens-Grau et al., 2013) by acting on muscarinic M₁- and M₂-receptors in dSPNs, M₁-receptors in dLN and D₁-receptors in corticostriatal synapses. Finally, in situ-cell calcium imaging recording (Carrillo-Rold et al., 2008, 2009a) demonstrated a decrease in network activity when muscarinic M₁-receptors were blocked with M₁-7, while selectivity of M₂-receptors for dSPNs was demonstrated in the activity of whole sets of simultaneously visualized neurons by setting out dSPNs from dLN using Bac1.1-SEP mice (Carrillo-Rold et al., 2009a).

5.2. A possible physiological relevance

The striatum is a large input structure of the basal ganglia. Major cortical (and pallidum) glutamatergic afferents enter the striatum and make monosynaptic contacts with SPNs and interneurons (Kawaguchi et al., 1985; Vicens-Chacon et al., 2013). Interneurons are activated after brief latencies by proximal terminal fields (Sauerbrey et al., 2010; Shen et al., 1998; Vicens-Chacon et al., 2013), while SPNs receive one or two pulses from each cortical afferent and respond monosynaptically and postsynaptically (Cowan and Wilson, 1994; Doye et al., 2010; Vicens-Chacon et al., 2013). Suprathreshold responses may last hundreds of milliseconds (Flores-Barrera et al., 2001) possible engaging inputs from interneurons (Flores-Barrera et al., 2002; Vicens-Chacon et al., 2003) and including a rebound if a delay in a non-linear dependent signaling such as that from muscarinic receptors (Vicens-Chacon et al., 2013; Calhoun et al., 1991). Participation of dopaminergic modulation in this synaptic activity has been demonstrated (Flores-Barrera et al., 2001; Jalilzadeh et al., 1997). Because both D₁ and M₂-receptors enhance current through Ca^v-channels, it is interesting to know if there is interaction between them. We found that a form of such receptors act together when muscarinic activation occurs first. This is interesting since dopaminergic modulation can also be triggered from the cortex (Scherer et al., 2014; de Lencastre and Silva, 2012). However, this happens through a more complex circuit and with a more prolonged latency. Therefore, these findings suggest that when the striatum is activated from the cortex, it would be expected that muscarinic and dopaminergic modulation may act in sequence to act in concert and drive others. This may also happen at cortical fields, since the release of acetylcholine may trigger dopamine release (Thirumala and Craig, 2011).

But dopamine modulation can also come from the brain stem (Fadnis et al., 2014). Perhaps, in this case, muscarinic modulation may be set on other dopaminergic activation. In such a case, the actions of dopamine may be restrained (Scherer, 2007). Therefore, the so called "balance" between the dopaminergic and cholinergic systems is an need of re-evaluation.

This functional re-evaluation is suggested by known pathways from the striatum to both the cortex and the brain stem (Thirumala, 2013). In fact, M₂-receptor signaling may go both ways, depending on the activated G-protein: it may rely on adenylyl cyclase activation to generate dopamine signaling (Nashman, 2000), or may help to inactivate adenylyl cyclase during the opposite (Nashman, 2000; Onai and Ulfhake, 2003).

6. Conclusions

The authors thank Dr. Capasa and Alzavalle for technical support. Dr. Rendón-Ureca collaborated in some experiments. Dr. Pérez-Cruz helped with analysis and made the simulation software. Graciela A. Hernández and Carolina Rodríguez with animal care. Back to

Do GFP transgenic mice were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center T42CD010918 and SE400017604-11. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM Grants (S-202814 to J. Burgos and IN-202914 to E. Galarraga, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México grant B-41-1 to J. Burgos and CONACYT – Dirección de Fomento y Desarrollo (CONACYT-DFO) Grant B-1110, IIC/III FONDINEI-2010 to J. Burgos, T. Hernández-Rivera had a CONACYT doctoral fellowship. Data in this work is part of her doctoral dissertation in the Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Abizaid, R.L., Wong, A.H., Parvez, J.A., 2002. The functions anatomy of head gene expression. *Trends Neurosci.* **25**, 266–275. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02418-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02418-X).
- Acedo, T., Motta, M., Serrati, T., Mochlyar, N., Mariani, E., 2010. Amyloid-beta deposits induce apoptosis in the nucleus accumbens. *Cerebr. Cortex* **20**, 145–157. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp111>. PMID: 19962006
- Ara, C., Corti, M.A., Tapp, D., Flores-Rivera, E., Perez-Dominguez, J.K., Rago, J., Galarraga, E., 2013. Distal differences of corticostriatal responses in striatal projection neurons depend on axonal arborization potassium currents. *Front. Behav. Neurosci.* **7** (8), <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00078>.
- Baigas, J., Hesse, S., Herwig, J., Cox, Y., Sanchez, L., 1994. Cellular and molecular characterization of GABA neurons in cortex, striatum, thalamus and midbrain. *J. Neurosci.* **14**, 6987–6999.
- Bard, J., Galarraga, E., Tapp, D., Flores-Rivera, E., Reyes, A., Burgos, J., 2010. Dopaminergic modulation of spiny neurons in the rat nucleus accumbens. *Mol. Neurosci.* **42**, 787–793. <https://doi.org/10.1016/j.molneuro.2010.04.007>.
- Beitner, C., Baker, L., Egan, M.F., Henik, S., Vuculic, M., LeKle, M., Edgerton, P., Greenberg, M.E., 2010. Cortical regulation of dopaminergic neurons in the midbrain via striatal afferents. *J. Neurosci.* **30**, 758–767. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2013.2010>.
- Bradley, R.K., 2000. Midbrain GABAergic cells from the guinea monkey. *Pharmacol. Ther.* **51**, 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)01044-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)01044-4).
- Buldrini, M., Xu, A., Costa, R.M., 2002. Dopaminergic effects of dopamine on neuronal firing rate and synchrony in the dorsal striatum. *Front. Integr. Neurosci.* **1** (2), <https://doi.org/10.3389/fnint.2002.00018>.
- Castillo-Rodriguez, L., Sánchez-López, A., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Brucher-Greif, R., Burgos, J., 2008. Encoding network states by action cell assemblies. *J. Neurophysiol.* **99**, 1425–1439. <https://doi.org/10.1152/jn.01212.2007>.
- Castillo-Rodriguez, L., Terceño, S., Pérez-Sandoval, G., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Burgos, J., 2010. Architecture of the cholinergic system and its computational properties in striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* **103**, 132–144. <https://doi.org/10.1152/jn.00757.2009>.
- Castillo-Rodriguez, L., Hernández-Cruz, A., Vuculic, M., Hernández, A., Vergara, B., Galarraga, E., Burgos, J., 2013. Massive enhancement of persistent action current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* **109**, 616–626. <https://doi.org/10.1152/jn.01712.2012>.
- Castillo-Rodriguez, L., Hernández-Cruz, A., López, B., Galarraga, E., Burgos, J., 2011. Dopaminergic modulation of the striatal midbrain complex-specific contribution of cell assemblies. *J. Neurosci.* **31**, 14177–14187. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1428-11.2011>.
- Chen, C., Bokil, H., Park, S., Park, S., Malenka, R.C., Bear, M.F., 1996. The in vivo development of the acetylcholine innervation in adult rat neocortex. *Neuroscience* **71**, 947–954. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)00280-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)00280-2).
- Cowan, R.L., Wilson, C.J., 1996. Spontaneous firing patterns and axonal projections of single cortical neurons in the rat model aquatic cortex. *J. Neurophysiol.* **75**, 17–30.
- Curran, E., Ferrer-Luna, J., Wines, J.B., Delworth, K., Dehn, J.P., Benditt, T., Mora-Gonzalez, J., 2014. Anagrelone ameliorates dopaminergic innervation of the midbrain nucleus accumbens originates in the striatum. *J. Neurosci.* **34**, 4737–4750. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1373-14.2014>.
- de Luna, V., Borsoi, R., 2012. Dopaminergic activity correlates with nucleus accumbens, by the frontal lobe. *Neuroscience* **218**, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.036>.
- Dolan, M.K., 1970. Intracellular studies of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* **13**, 231–236. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(70\)90110-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(70)90110-0).
- Feng, J., Groman, J.A., Teich, T., Zhou, X., Solberg, L.A., Hori, E., Izumi, F., Wilson, C.J., Hagan, H.E., Sanchez, D., 2005. BDNF-dependent maturation of a postsynaptic function in cortical corticostriatal synapses following dopamine depletion. *Neurosci.* **16**, 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.04.020>.
- Feng, J.B., Groman, J.A., Peterson, J.D., Goldberg, J.A., Sanchez, D.J., 2010. Basal ganglia of corticostriatal signaling by dopamine innervation. *Neurosci.* **37**, 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.02.014>.
- Feng, C.J., Sheng, J.K., Carr, P.J., 2010. Allosteric activation of muscarinic receptors in rat septal nucleus by a novel CNS alkaloid. *Mol. Neurosci.* **31**, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molneuro.2010.02.018>.
- Doty, K.M., Moss, J., Blum, J.P., 2010. Cortical and striatal gene expression of direct and indirect pathway medium spiny neurons in mouse striatum. *J. Neurosci.* **30**, 1665–1678. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0120-10.2010>.
- Dubin, V., Isack, S., 1995. Calcium channels involved in the inhibition of acetylcholine release by presynaptic muscarinic receptors in rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* **272**, 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0962-2802\(95\)00271-1](https://doi.org/10.1016/S0962-2802(95)00271-1).
- Dubin, J., Strömberg, J., Isack, S., Filipsson, J., Björnsdóttir, B., Skerfving, M., Carlsson, A., 2005. Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in rat. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 8041–8054. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5881-12.2012>.
- Domercq, A., Colomero, E., Burgos, J., 2010. Muscarinic receptors involved in the subthalamic nucleus activity of hemiparkinsonian mice. *Synapse* **68**, 215–223. <https://doi.org/10.1002/syn.21144>.
- Flores-Rivera, E., Vuculic, M., Tapp, D., Burgos, J., Galarraga, E., 2010. Differential corticostriatal integration in spiny project neurons in indirect and direct pathways. *Front. Syst. Neurosci.* **4** (15), <https://doi.org/10.3389/fnins.2010.00015>.
- Flores-Rivera, E., Vuculic, M., Tapp, D., Burgos, J., Tapp, D., Galarraga, E., 2011. Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny project neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* **5** (6), <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00006>.
- Freder, Gailford, K., Morison, S., Marquis, C., Weiss, A., Stevens, D., 2008. Identification of a striatal GABAergic interneuron class of the muscarinic receptor $\alpha 4 \beta 2$ nAChR binding site. *J. Mol. Neurosci.* **35**, 1661–1673. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9288-2>.
- Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Reyes, A., Rodríguez, J., Burgos, J., 1997. Dopamine facilitates striatal EPSPs through a 1-type Ca^{2+} coordination. *Neuroreport* **8**, 2183–2187.
- Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Torres, A., Miranda, J., Hernández-Rivera, T., Vuculic, M., Burgos, J., 2012. Dopaminergic modulation of corticostriatal output: a functional segregation between different types of muscarinic receptors. *J. Neurosci.* **32**, 1724–1730.
- García, G.H., Zamora, D.J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Actas Soc. Neuroci.* **34**, 641–645. <https://doi.org/10.1016/j.actasoc.2011.07.010>.
- García, G.H., Wong, J.F., 2003. Distribution of anatomical and morphological properties of neurons in the rat globus pallidus: a comparison with the globus pallidus of the monkey and the human. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **27**, 161–180. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00044-0).
- Colling, C., King, G., Sorensen, B.J., 2012. Muscarinic modulation of striatal function and activity. *Handb. Exp. Pharmacol.* **209**, 247–261. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23734-9_10.
- Hernández-González, I., Galarraga, E., Burgos, J., 1995. Dopamine-dependent peak in striatal GABAergic presynaptic modulation of glutamate afferents in rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology* **32**, 1493–1500. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)00751-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)00751-7).
- Hernández-González, I., Hernández-Cruz, A., Pérez-Sandoval, G., Pérez-Sandoval, A., Sánchez-López, A., Galarraga, E., Burgos, J., 2010. Modulation of Ca^{2+} currents by sequential and simultaneous activation of adenosine A_2 and A_3 receptors in striatal projection neurons. *Neurosci. Signal.* **3**, 207–211. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9183-4>.
- Hernández-López, S., Burgos, J., Sánchez, E.J., Reyes, A., Galarraga, E., 1997. Muscarinic activation enhances striatal discharge in nucleus accumbens medium spiny neurons by modulating 1-type Ca^{2+} channels. *J. Neurosci.* **17**, 2334–2342.
- Hernández-López, S., Torch, E., Pérez-Cerdá, E., Galarraga, E., Burgos, J., Sánchez, E.J., 2010. D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons induce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel Ca^{2+} channel modulation-signaling cascade. *J. Neurosci.* **30**, 8987–8997.
- Higley, M.J., Solis-Llavina, G.F., Sabatini, B.L., 2009. Dopaminergic modulation of midbrain GABAergic cells regulates striatal synaptic potency and integration. *Neurosci.* **12**, 1121–1128. <https://doi.org/10.1006/nb.2009.12085>.
- Hise, A.H., Zamora, D., 1995. Muscarinic receptors modulate N_A-P₂ and L-type Ca^{2+} currents in striatal neurons through pertussis toxin. *J. Neurosci.* **15**, 473–480.
- Hise, A.H., Dixon, K.J., Terry, G.D., 1997. High-voltage-activated Ca^{2+} channels and rat muscarinic acetylcholine receptors in identified thalamostriatal neurons. *Synapse* **27**, 357–364. <https://doi.org/10.1002/syn.21047>.
- Jádra, O., Castillo-Rodriguez, L., Hernández-Cruz, A., Brucher-Greif, R., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., 2010. Dynamics of the corticostriatal midbrain cholinergic innervation in a dynamic network state. *J. Neurosci.* **30**, 17727–17737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11299-10.2010>.
- Joss, J., Fentner, B., Giffman, G., Widdige, D.S.D., Oll, W.H., Teske, A.A., 2010. A subpopulation of nucleus accumbens muscarinic acetylcholine receptors plays a crucial role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J. Neurosci.* **30**, 2944–2953. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5944-09.2010>.
- Jordanova, E., Kunitz, E., Alford, P., Quillock, J., Ferris, A., Bell, V.E., Duran, E., Gerstaecker, C., 2010. 30-cyclic GMP- α case: pharmacological profile for the muscarinic cholinergic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **34**, 240–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.02.018>.
- Kyriakou, S., Jankovic, M., Kraljicic, E., Gail, P., Adam, J., 2013. GABAergic cells with high affinity for striatal $\alpha 4 \beta 2$ muscarinic acetylcholine receptors. *Toxicol. Lett.* **212**, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.toxic.2012.08.018>.
- Kyriakou, S., Wilson, C.J., Angelou, S.J., Emson, P.J., 1995. Striatal interneuronal chemical, physiological and morphological characterization. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **19**, 527–535. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)00044-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)00044-0).

