



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Papel de los receptores dopaminérgicos D₃ y D₄ en
la interacción recíproca
glutamato/dopamina/GABA en la *sustancia nigra*
pars reticulata de la rata**

T E S I S

Q U E P R E S E N T A

I.B.Q. Víctor Eduardo Ayala González

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, D.F.

Diciembre, 2013

El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorios 4, 7 y 38 de Neurociencias, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 152326.

A mis Padres, Virginia y Eduardo:

Su apoyo representa lo más importante y nunca podré expresar mi verdadero agradecimiento.

Este trabajo, por ustedes y para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme superar las adversidades y nunca claudicar.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño

La confianza que depositó en mi fue crucial para no caer en el desánimo durante los momentos difíciles. Gracias por su guía y por el afecto, siempre será más fácil trabajar entre amigos y usted nos lo demuestra día a día. Gracias, Doctor.

Al Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

Sus enseñanzas y consejos fueron fundamentales para la realización de este proyecto. El tiempo que invirtió en él y la amistad que me brindó fueron los insumos más valiosos con que conté para realizarlo. La disposición es una característica rara. No en usted, gracias siempre.

A mis sinodales,

Dra. María del Carmen García García

Dr. Jorge Aceves Ruiz

Por su valiosas contribuciones durante el desarrollo de este trabajo, tanto en seminarios como en la revisión de este documento. Gracias.

Al Dr. Sergio Enrique Meza Toledo

Por representar un pilar en mi formación académica y permitirme conocer el mundo de las neurociencias bajo su tutela. Por no olvidar a los que alguna vez fuimos sus alumnos y tender su mano para brindar ayuda. Gracias.

A mi hermano, Daniel

Por su invaluable ayuda en la elaboración de este escrito. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio

Gracias por los momentos agradables que pasamos, por las palabras de aliento y hasta por los regaños. De todos y de todo se aprende. De ustedes aprendí muchas cosas que no olvidaré. En verdad, gracias.

“I wondered ‘Was it me? Was it them? Was there something I could have done differently?’ You know, you have perceptions of certain things and you are promised certain things, and when they don't pan out the way you expect, you have to readjust. Either you wilt in the face of it. Or you get stronger”.

-Brandon Routh

ÍNDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Ganglios Basales	14
1.1.1 Fisiología y Organización de los Ganglios Basales	14
1.1.1.1 Núcleo Estriado	15
1.1.1.2 Globo Pálido	15
1.1.1.3 Núcleo Subtalámico.....	16
1.1.1.4 Sustancia Nigra.....	16
1.1.1.4.1 Sustancia Nigra pars compacta	17
1.1.1.4.2 Sustancia Nigra pars reticulata.....	17
1.1.2 Organización Funcional de los Ganglios Basales	19
1.1.2.1 Vía Directa.....	19
1.1.2.2 Vía Indirecta	20
1.1.2.3 Sinergismo de ambas vías	21
1.1.3 Participación de los Ganglios Basales en el control motor	21
1.1.4 Patologías de los Ganglios Basales	21
1.1.4.1 Enfermedad de Parkinson.....	22
1.2 Dopamina y Receptores Dopaminérgicos	24
1.2.1 Dopamina	24
1.2.1.1 Síntesis y Liberación	25

1.2.1.2 Metabolismo	26
1.2.2 Receptores Dopaminérgicos.....	28
1.2.2.1 Familia D ₁	29
1.2.2.2 Familia D ₂	29
1.2.2.2.1 Receptores D ₂	29
1.2.2.2.2 Receptores D ₃	30
1.2.2.2.3 Receptores D ₄	31
1.2.3 Señalización	32
1.2.3.1 Familia D ₁	34
1.2.3.2 Familia D ₂	36
1.2.4 Farmacología de los receptores dopaminérgicos.....	38
1.2.4.1 Familia D ₁	38
1.2.4.2 Familia D ₂	38
1.2.4.2.1 Receptor D ₂	39
1.2.4.2.2 Receptor D ₃	39
1.2.4.2.3 Receptor D ₄	39
1.3 Microdiálisis y HPLC	40
1.3.1 Microdiálisis Cerebral	40
1.3.2 HPLC.....	42
1.3.2.1 Detección Electroquímica (HPLC/ECD)	43
1.3.2.2 Detección Fluorométrica (HPLC/FD)	43
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	45
2.1 Interacción entre los neurotransmisores dopamina, glutamato y GABA en la sustancia nigra pars reticulata.....	45

ÍNDICE

2.2 Modulación de la entrada glutamatérgica subtálamo-nigral por receptores D ₃	48
2.3 Modulación de la entrada GABAérgica pálido-nigral por receptores D ₄	50
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
4. JUSTIFICACIÓN.....	52
5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	52
6. OBJETIVOS.....	53
6.1 Objetivo General	53
6.2 Objetivos Específicos.....	53
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
7.1 Animales de experimentación	54
7.2 Cirugía Estereotáxica	54
7.3 Experimentos de microdiálisis	55
7.3.1 Estrategias farmacológicas	57
7.4 Cuantificación de dopamina por HPLC	58
7.5 Cuantificación de GABA y glutamato por HPLC.....	58
7.6 Histología	59
7.7 Análisis Estadístico	59
8. RESULTADOS.....	60
8.1 Canulación en la sustancia nigra pars reticulata	60
8.2 Niveles Basales de dopamina, GABA y glutamato en la SNr	61
8.3 Efecto de la perfusión de N-metil-D-aspartato en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato	61
8.4 Efecto de la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato	62

ÍNDICE

8.5 Efecto del antagonismo de los receptores D ₁ sobre los aumentos de dopamina, glutamato y GABA producidos por la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	62
8.6 Efecto del antagonismo de los receptores NMDA sobre el aumento en los niveles de glutamato y dopamina producidos por la perfusión conjunta de SCH 23390 y GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	63
8.7 Efecto de la perfusión de L-745,870 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato	64
8.8 Efecto del antagonismo de los receptores D ₁ sobre el aumento en los niveles de GABA, dopamina y glutamato producidos por la perfusión de L-745,870 y NMDA, respectivamente, en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	64
9. DISCUSIÓN.....	72
9.1 Consideraciones metodológicas	72
9.2 Concentraciones basales de dopamina, GABA y glutamato.....	74
9.3 Control glutamatérgico sobre la liberación de dopamina en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	74
9.4 Papel de los receptores D ₃ en la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	76
9.5 Participación de los receptores D ₁ sobre la interacción glutamato/dopamina/GABA producida por el antagonismo de receptores D ₃	78
9.6 Liberación de glutamato como paso inicial en la interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	79
9.7 Papel de los receptores D ₄ en la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia pars reticulata de la rata	82
9.8 Participación de los receptores D ₁ en la liberación palidal de GABA producida por el antagonismo de los receptores D ₄	84
9.9 Modelo de interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata	85
9.10 Consideraciones Adicionales	89
10. CONCLUSIONES.....	91
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Ubicación anatómica de los Ganglios Basales en el cerebro humano	14
Figura 2. Inervación dopaminérgica en la sustancia nigra pars reticulata.....	19
Figura 3. Esquema del modelo clásico de los Ganglios Basales	20
Figura 4. Esquema del modelo clásico de los Ganglios Basales en estado parkinsonico	23
Figura 5. Biosíntesis de dopamina.....	25
Figura 6. Liberación sináptica de dopamina.....	26
Figura 7. Principales mecanismos catabólicos de la dopamina.....	27
Figura 8. Estructura del receptor para dopamina.....	28
Figura 9. Ciclo de activación de las proteínas G.	33
Figura 10. Tráfico de GPCRs: Desensibilización e internalización	34
Figura 11. Vías de señalización de los receptores para dopamina de la familia D ₁	36
Figura 12. Vías de señalización de los receptores para dopamina de la familia D ₂	37
Figura 13. Microdiálisis Cerebral	41
Figura 14. Fundamento de la detección electroquímica	43
Figura 15. Reacción de derivatización	44
Figura 16. Efecto de la inyección de carbacol en el núcleo subtalámico sobre los niveles de dopamina, GABA y glutamato en la sustancia nigra pars reticulata	45
Figura 17. Efecto de la perfusión de NMDA en la sustancia nigra pars reticulata sobre los niveles de dopamina, GABA y glutamato	46
Figura 18. Efecto de la perfusión de SCH 23390 sobre los aumentos de dopamina, GABA y glutamato inducidos por la perfusión de NMDA en la sustancia nigra pars reticulata	46
Figura 19. Representación gráfica de la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata.....	47

ÍNDICE

Figura 20. Autorradiografía del sitio de unión a receptores D ₃ en el cerebro de rata	48
Figura 21. La activación de receptores de la familia D ₂ disminuye las corrientes postsinápticas excitatorias subtálamo-nigrales.....	49
Figura 22. Inmunorreactividad para el receptor D ₄ en los Ganglios Basales	50
Figura 23. La inhibición de la liberación de [³ H]GABA estimulada por dopamina en la sustancia nigra reticulata está mediada por receptores D ₄	51
Figura 24. Posición de ingreso de la cánula de microdiálisis en la SNr.....	55
Figura 25. Esquema de la cánula de microdiálisis.....	56
Figura 26. Fotografía representativa de la ubicación correcta de la cánula de microdiálisis en la sustancia nigra pars reticulata	60
Figura 27. Efecto de la perfusión de N-metil-D-aspartato en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, glutamato y GABA	66
Figura 28. Efecto de la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de glutamato, dopamina y GABA	67
Figura 29. Efecto de la perfusión de SCH 23390 sobre el aumento en las concentraciones basales de glutamato, dopamina y GABA producidos por la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata.....	68
Figura 30. Efecto del antagonismo de los receptores NMDA sobre el aumento en los niveles de glutamato y dopamina producidos por la perfusión conjunta de SCH 23390 y GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	69
Figura 31. Efecto de la perfusión de L-745,870 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato	70
Figura 32. Efecto del bloqueo de los receptores D ₁ sobre el aumento en los niveles de GABA, dopamina y glutamato producidos por la perfusión de L-745,870 y NMDA, respectivamente, en la sustancia nigra pars reticulata de la rata	71
Figura 33. Modelo de interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata	88
Tabla 1. Esquema de perfusión de fármacos	57
Tabla 2. Concentraciones basales de dopamina, GABA y glutamato en la sustancia nigra pars reticulata de la rata despierta y en libre movimiento	61

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CPu	Caudo-putamen (Estriado)
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidrofenilacético
EPSCs	Corrientes postsinápticas excitatorias
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLU	Glutamato
GP	Globo Pálido
GPCRs	Receptores acoplados a Proteínas G
GPe	Globo Pálido externo
GPi	Globo Pálido interno
HVA	Ácido Homovanílico
KO	Knock out
L-DOPA	L-3,4-Dihroxifenilalanina
MAO	Monoamino oxidasa
MSNs	Neuronas espinosas medianas
NMDA	N-metil-D-aspartato
PD	Enfermedad de Parkinson
PKA	Proteíncinasa A
SN	Sustancia Nigra
SNe	Sustancia Nigra pars compacta
SNr	Sustancia Nigra pars reticulata
STN	Núcleo Subtalámico
TH	Tirosina hidroxilasa
VTA	Área Ventral tegmental

RESUMEN

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales interconectados cuya interacción es crucial para la ejecución del movimiento voluntario. Los trastornos en su dinámica dan lugar a diversos desórdenes de movimiento como la enfermedad de Parkinson, entre otros, lo que destaca la importancia de estudiar su funcionamiento.

Dentro de los ganglios basales, la sustancia nigra pars reticulata (SNr) representa el principal núcleo de integración y salida de información, al converger en él las vías directa e indirecta. De estas recibe información inhibitoria y excitatoria, respectivamente, cuya influencia conjunta habrá de determinar si se lleva a cabo o no la ejecución del movimiento. Hace algunos años, nuestro grupo de trabajo propuso una interacción local de neurotransmisores a nivel de la SNr entre glutamato (GLU), GABA y dopamina (DA), actuando esta como moduladora a nivel presináptico de la liberación de los mencionados.

Dicha propuesta establecía que la salida de GLU estimula la salida de DA -mediante la activación de receptores NMDA localizados en las dendritas de las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (SNc)-, activando esta receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales y subtálamo-nigrales, provocando la liberación de GABA y GLU, respectivamente.

El modelo propuesto no contemplaba la participación de los receptores D₃ en las terminales subtalámicas en la SNr, ni los D₄, presente en las aferentes pálido-nigrales, por lo que fue materia del presente trabajo dilucidar dicha participación.

Los experimentos de microdiálisis realizados en este proyecto, muestran que el antagonismo de los receptores D₃ en las proyecciones subtálamo-nigrales, produce un aumento en los niveles extracelulares de glutamato, lo que sugiere la actividad tónica de dicho receptor, actuando como un “freno” ante la salida espontánea del neurotransmisor, provocando además la salida de dopamina y GABA.

Por otra parte, los receptores D₄ presentes en las terminales pálido-nigrales, también parecen estar tónicamente activos, pues su antagonismo produce un aumento en la concentración extracelular de GABA, independiente del aumento producido por la activación de los receptores D₁, lo que sugiere que la interacción glutamato/dopamina/GABA mediada por receptores D₃ es independiente funcional y anatómicamente, de la liberación de GABA desde las aferentes pálido-nigrales.

ABSTRACT

ABSTRACT

The basal ganglia are a group of interconnected subcortical nuclei which interaction is crucial to the execution of voluntary movement. Disruptions in their functioning cause several movement disorders like Parkinson's disease, among others, which highlight the importance of studying them.

Within the basal ganglia, the substantia nigra pars reticulata (SNr) represents the main integrative and output nuclei, converging in it the direct and indirect pathways. From these, the SNr receives both inhibitory and excitatory input, respectively, which joint influence will determine if movement happens or not.

Some years ago, our research group proposed a local presynaptic neurotransmitter interaction in the SNr, between glutamate (GLU), GABA and dopamine (DA), being the latter a modulator for the other neurotransmitters release.

This interaction established that glutamate release raises DA extracellular concentration -by activating NMDA receptors located on the dendrites of substantia nigra pars compacta (SNc) neurons-, in turn, DA activates D₁ receptors on striatonigral and subthalamic-nigral axons, causing the release of GABA and glutamate, respectively.

The proposed model doesn't consider the involvement of D₃ receptors on subthalamic-nigral terminals, or D₄ receptors, present on globus pallidus terminals in the SNr. Establishment of said involvement is the main goal of this work.

Microdialysis experiments were performed to fulfill the objective. The results show that the antagonism alone of D₃ receptors on subthalamic-nigral afferents caused a raise in glutamate extracellular levels, suggesting that those receptors are tonically active, acting like a "brake" to glutamate's spontaneous release

On the other hand, D₄ receptors expressed on globus pallidus terminals in the SNr also seem to be tonically active as their antagonism alone raised GABA extracellular concentration, being this raise independent from the increase caused by activation of the above-mentioned D₁ receptors. Taken together, the data obtained suggest that the glutamate/dopamine/GABA interaction previously explained is independent functionally and anatomically from the GABA release on pallidal-nigral afferents caused by D₄ receptors activation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GANGLIOS BASALES

1.1.1 Fisiología y organización anatómica de los ganglios basales

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que se extienden a través del telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo (Albin *et al.*, 1989).

Están involucrados en una gran variedad de procesos que incluyen funciones motoras, asociativas, cognitivas y mnemónicas. La división dorsal de los ganglios basales consiste del estriado (divido a su vez en los subnúcleos caudado y putamen), el globo pálido (GP, segmento externo del globo pálido en primates, GPe), el núcleo entopeduncular (EP, segmento interno del globo pálido en primates, GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra (SN) dividida a su vez en dos partes principales, la parte compacta (SNc) y la parte reticulada (SNr) (Fig. 1). Además de estas estructuras asociadas con funciones motoras y asociativas, existe una división ventral de los ganglios basales (estriado ventral o núcleo accumbens, pálido ventral y área ventral tegmental), que se asocia con funciones límbicas (Bolam *et al.*, 2000).

Aunque no se consideran parte de los ganglios basales como tales, la corteza y el tálamo ventro-lateral participan activamente en los circuitos motores que se detallarán más adelante, por lo que es imprescindible su mención.

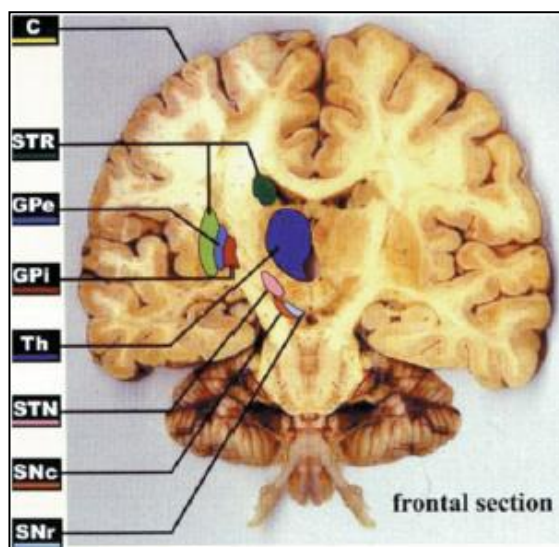


Figura 1. Vista coronal del cerebro, mostrando los núcleos de los ganglios basales. La sección se anguló rostrocaudalmente para encontrar la mayoría de los ganglios basales en una sola sección. C, corteza; STR, estriado; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; Th, tálamo; STN, núcleo subtalámico; SNc, sustancia nigra compacta; SNr, sustancia nigra reticulada. (Tomado de Obeso *et al.*, 2002).

INTRODUCCIÓN

1.1.1.1 Núcleo Estriado

El estriado es la estructura primaria de entrada de información a los ganglios basales. Se divide en estriado dorsal, a su vez dividido en caudado y putamen; y en estriado ventral, que comprende al núcleo accumbens y a las porciones estriatales del tubérculo olfatorio (Bar-Gad *et al.*, 2003). En roedores, se encuentra como una estructura única y homogénea denominada neostriado.

Las principales aferentes hacia el estriado provienen de la corteza cerebral, el tálamo -ambas de naturaleza glutamatérgica- y de la sustancia nigra pars compacta (SNc), esta última de naturaleza dopaminérgica (Parent and Hazrati, 1995a).

El principal grupo neuronal en el estriado son las neuronas espinosas medianas (MSNs, por sus siglas en inglés), y representan alrededor del 95% de la totalidad de neuronas estriatales (Kemp and Powell, 1971). Son de naturaleza GABAérgica y solo esta estirpe neuronal proyecta hacia los circuitos de los Ganglios Basales (Kita and Kitai, 1988). El 5% restante está integrado por interneuronas de naturaleza GABAérgicas y colinérgicas, principalmente (Tepper and Bolam, 2004).

Las neuronas de proyección estriato-nigral que proyectan directamente a los núcleos de salida: el globo pálido interno (primates) / núcleo entopeduncular (roedores) y a la SNr (Kreitzer, 2009) expresan al receptor dopaminérgico D₁ y al neuropéptido denominado sustancia P (Yung *et al.*, 1996). En contraste, las neuronas de proyección estriato-palidales que envían axones al globo pálido externo (Kreitzer, 2009) expresan al receptor dopaminérgico D₂ y presentan inmunorreactividad a encefalina (Yung *et al.*, 1996).

Tras la demostración de que las neuronas estriato-nigrales también expresan al receptor dopaminérgico D₃ (Ariano and Sibley, 1994; Diaz *et al.*, 1995; Surmeier *et al.*, 1996) recientemente se descubrió que dicho receptor no solo colocaliza con el receptor D₁, sino que ambos forman un heterodímero (Fiorentini *et al.*, 2008) que potencia la liberación de GABA hacia la SNr, cuando ambos receptores son coactivados (Cruz-Trujillo *et al.*, 2013).

1.1.1.2 Globo Pálido

El globo pálido en primates está comprendido por el globo pálido interno (GPi) y el globo pálido externo (GPe), mientras que en los roedores el segmento interno corresponde al

INTRODUCCIÓN

núcleo entopeduncular (EP) y el segmento externo corresponde al globo pálido (GP) (Shin *et al.*, 2003).

El globo pálido es una estructura de naturaleza GABAérgica que recibe aferentes estriatales principalmente; también recibe inervación dopaminérgica proveniente de la SNc. Está conectado recíprocamente al núcleo subtalámico y proyecta directamente a los núcleos de salida: el GPi y la SNr (Bar-Gad *et al.*, 2003).

Además de las proyecciones antes mencionadas, también se han identificado aferentes palidales en el tálamo, colículo superior y el pedúnculo pontino (Parent and Hazrati, 1995b)

Las neuronas palidales expresan al receptor dopaminérgico D₄ (Ariano *et al.*, 1997) tanto en el soma (Mrzljak *et al.*, 1996), como en las proyecciones hacia el núcleo subtalámico y núcleo reticular del tálamo (Flores *et al.*, 1999; Floran *et al.*, 2004b; Floran *et al.*, 2004a), además de a la SNr (Khan *et al.*, 1998; Acosta-Garcia *et al.*, 2009; Erlij *et al.*, 2012).

1.1.1.3 Núcleo Subtalámico

El núcleo subtalámico (NST) es el único de naturaleza glutamatérgica dentro de los ganglios basales y su modulación principal es a través de las aferentes GABAérgicas palidales. También recibe proyecciones desde la corteza cerebral, núcleo pedúnculo pontino, núcleo raquídeo dorsal y de la SNc (Bar-Gad *et al.*, 2003).

El NST a su vez envía proyecciones al GPe, dichas proyecciones expresan receptores dopaminérgicos del tipo D₂/D₃ (Hernandez *et al.*, 2006).

Por otra parte, también envía aferentes directamente a la SNr, que expresan tanto receptores dopaminérgicos de la familia D₁ (Rosales *et al.*, 1997; Flores *et al.*, 1999; Baufreton *et al.*, 2003) así como de la familia D₂ (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006).

Es de destacar que esta inervación glutamatérgica en la SNr, solo representa el 10% de los botones sinápticos en dicho núcleo. (Parent and Hazrati, 1995b)

1.1.1.4 Sustancia Nigra

La sustancia nigra se divide a su vez en dos subnúcleos: la sustancia nigra compacta (SNc), que se encuentra densamente poblada y la sustancia nigra reticulada (SNr), que se encuentra adyacente de manera ventral a la antes mencionada.

INTRODUCCIÓN

1.1.1.4.1 Sustancia Nigra pars compacta

La sustancia nigra compacta es un núcleo de naturaleza dopaminérgica que además contiene neuromelanina (Blandini *et al.*, 2000) y que envía proyecciones axonales hacia el estriado, núcleo subtalámico y globo pálido.

Además, envía dendritas -capaces también de liberar dopamina- hacia la sustancia nigra reticulada (Wassef *et al.*, 1981) (Fig. 2).

Por otra parte, recibe aferentes glutamatérgicas del núcleo subtalámico (Carter, 1982) , que estimulan la liberación de dopamina (Rosales *et al.*, 1997) así como del núcleo pedúnculo pontino (Smith *et al.*, 1996).

También posee neuronas de proyección GABAérgica provenientes tanto del estriado como del globo pálido (Blandini *et al.*, 2000) y se ha sugerido la proyección neuronal desde la SNr hacia la SNc (Hajos and Greenfield, 1993; Tepper *et al.*, 1995).

En este núcleo se expresan diversos receptores, entre los que destacan los NMDA y los GABA_A. Así mismo, en el soma y en las dendritas se ha encontrado la expresión de autorreceptores dopaminérgicos del tipo D₂ (Santiago and Westerink, 1991).

La inervación dopaminérgica dada por la SNc ha demostrado ser crucial (Alexander and Crutcher, 1990; Gerfen, 2000; Obeso *et al.*, 2000) para el correcto funcionamiento de los circuitos motores dentro de los ganglios basales, y es su pérdida la que origina patologías como la enfermedad de Parkinson.

1.1.1.4.2 Sustancia Nigra pars reticulata

La sustancia nigra reticulada (SNr) y el globo pálido interno (GPi) (o el núcleo entopeduncular en roedores) tienen un papel importante dentro de la fisiología de los ganglios basales, pues en ellos convergen las vías de información, es decir, son los núcleos de salida de información (Zhou and Lee, 2011).

La SNr se localiza en el mesencéfalo ventral y es de naturaleza GABAérgica (Fig. 2).

Este núcleo posee inervación tanto GABAérgica, proveniente del globo pálido (Smith and Bolam, 1989; Bevan *et al.*, 1994), del estriado (Alexander and Crutcher, 1990; Gerfen *et al.*, 1990; Bolam *et al.*, 2000) así como glutamatérgica proveniente del núcleo subtalámico (Smith and Parent, 1988; Deniau *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

Mediante estudios histoquímicos, también se ha demostrado que la SNr recibe inervación serotoninérgica densa proveniente de neuronas en el núcleo del rafé (Steinbusch, 1981; Wallman *et al.*, 2011), así como inervación colinérgica proveniente del núcleo pedúnculo pontino principalmente (Woolf and Butcher, 1986; Gould *et al.*, 1989).

Un blanco primario de las neuronas de proyección de la sustancia nigra reticulada es el tálamo ventromedial y ventrolateral (Beckstead *et al.*, 1979; Di Chiara *et al.*, 1979) pero también envía aferentes al colículo superior (Parent and Hazrati, 1995a) que poseen un papel importante en movimiento oculares y tareas de atención (Bar-Gad *et al.*, 2003).

Así mismo, existen proyecciones colaterales hacia sí misma que ejercen una importante acción inhibitoria, es decir, tanto la SNc como la propia SNr son localmente inhibidas vía axones colaterales GABAérgicos (Deniau *et al.*, 1982; Tepper *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 2004).

La SNr, expresa receptores glutamatérgicos -tanto NMDA como AMPA-, GABAérgicos -GABA_A y GABA_B- (Zhou and Lee, 2011) así como serotoninérgicos -principalmente el 5-HT_{2C}- (Pazos *et al.*, 1987; Mengod *et al.*, 1990) y colinérgicos -nicotínicos y muscarínicos- (Zhou and Lee, 2011).

Es de destacar que la sustancia nigra reticulada posee actividad tónica, debida principalmente a la expresión de canales iónicos como los de sodio dependientes de voltaje (Na_v), que, al estar tónicamente activos permiten una corriente persistente de dicho ion. Los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) son los responsables de la repolarización membranal tras el potencial de acción, y los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v), además de los canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}), también influyen de manera importante dicha actividad tónica (Atherton and Bevan, 2005; Zhou and Lee, 2011).

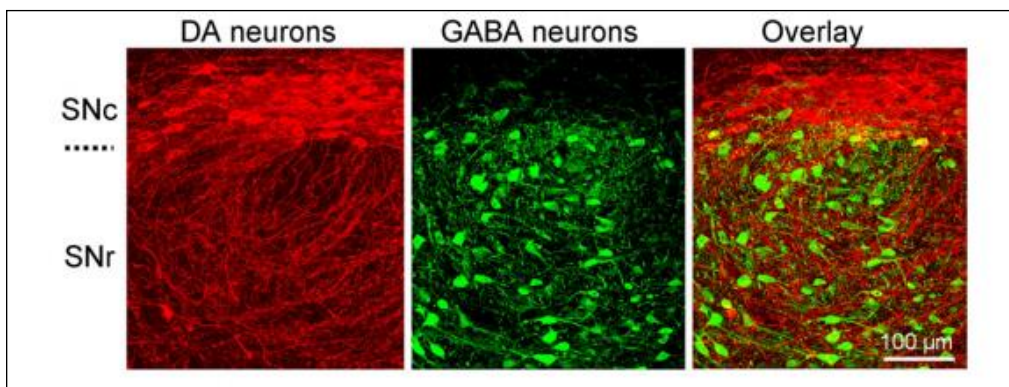


Figura 2. Imágenes confocales de tinción de doble inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH, en rojo, la enzima clave para la síntesis de dopamina) y parvalbúmina (PV, en verde, expresada solo en neuronas GABAérgicas) (Tomado de Zhou and Lee, 2011).

1.1.2 Organización funcional de los Ganglios Basales

Los cinco núcleos que conforman a los ganglios basales se interconectan entre sí dando lugar a dos vías paralelas de información: la vía directa, considerada como promotora del movimiento y la vía indirecta, que se dice, inhibe el movimiento (Fig. 3).

El llamado “modelo clásico de los Ganglios Basales” está bien establecido (Albin *et al.*, 1989; Alexander and Crutcher, 1990; Bolam *et al.*, 2000; Obeso *et al.*, 2000) y de acuerdo a este, el núcleo estriado recibe proyecciones corticales glutamatérgicas dando lugar a la entrada de información de ambas vías, siendo la SNr el núcleo de salida de información.

1.1.2.1 Vía Directa

Se compone de neuronas estriatales GABAérgicas que establecen una conexión monosináptica directa desde el putamen hacia la SNr/GPi. Dichas neuronas de proyección se caracterizan bioquímicamente por expresar principalmente al receptor dopaminérgico D₁ y a los péptidos Sustancia P y dinorfina (Obeso *et al.*, 2002).

La activación de la vía directa inhibe a los núcleos de salida (SNr/GPi), de manera que estos a su vez son incapaces de inhibir al tálamo ventrolateral, que se encontrará libre para ejercer su acción glutamatérgica excitatoria sobre la corteza motora, dando lugar al movimiento.

INTRODUCCIÓN

1.1.2.2 Vía Indirecta

Las neuronas estriatales GABAérgicas que dan origen a la vía indirecta se caracterizan bioquímicamente por la expresión del receptor dopaminérgico D₂ y del péptido Encefalina (Obeso *et al.*, 2008b). Estas eferentes estriatales son proyectadas al globo pálido externo que quedará inhibido. El globo pálido externo envía a su vez proyecciones también de naturaleza GABAérgica al núcleo subtalámico, sin embargo, al estar el primero inhibido, no podrá ejercer su acción inhibitoria sobre el segundo.

El núcleo subtalámico entonces está libre para ejercer su acción glutamatérgica (excitatoria) sobre los núcleos de salida (SNr/GPi), promoviendo su disparo neuronal y el consecuente aumento en la liberación del neurotransmisor principal de estos (GABA).

De esta forma, los núcleos de salida inhiben al tálamo ventrolateral, que no podrá ejercer su acción glutamatérgica (excitatoria) sobre la corteza motora, inhibiéndose con esto el movimiento (Alexander and Crutcher, 1990).

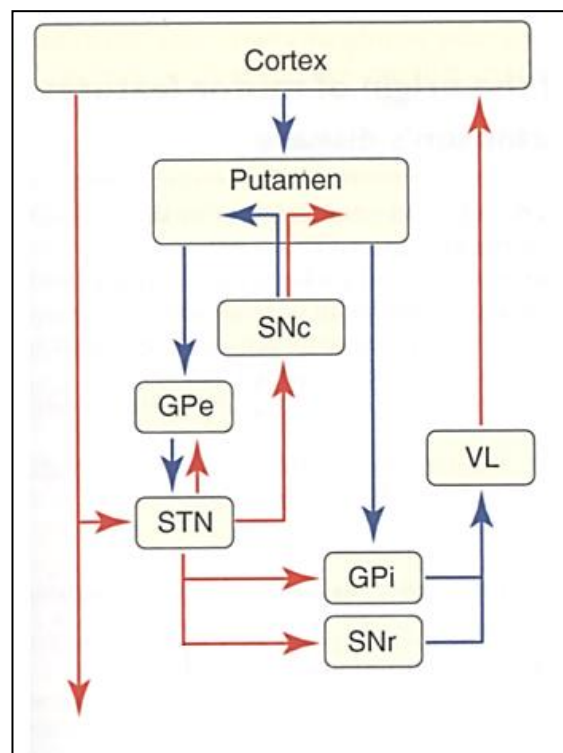


Figura 3. Esquema del modelo clásico de los ganglios basales. Las flechas azules indican proyecciones inhibitorias y las flechas rojas indican proyecciones excitatorias. El estriado se comunica vía neuronas de salida con el Globo Pálido interno (GPi) y la Sustancia Nigra reticulada (SNr), a través de una vía directa; y con el Globo Pálido externo y el Núcleo Subtalámico a través de una vía indirecta. SNc, Sustancia Nigra compacta; VL, tálamo ventrolateral. (Modificado de Obeso *et al.*, 2000).

INTRODUCCIÓN

1.1.2.3 Sinergismo de ambas vías

La dopamina es suministrada a ambos circuitos por la parte ventral de la sustancia nigra compacta (SNc) (Smith and Kieval, 2000) y al activar a los receptores dopaminérgicos produce un efecto sinergista de ambas vías, lo que ulteriormente conduce al movimiento.

Es decir, al activar a los receptores D₁ en las neuronas estriato-nigrales, se aumenta la actividad de estas, asegurando la inhibición de los núcleos de salida, dejando al tálamo libre para estimular a la corteza motora.

Al activarse los receptores D₂ en las neuronas de proyección estriato-palidales, disminuye la actividad de estas, lo que impide la inhibición del GPe, teniendo como resultado la inhibición del núcleo subtalámico, la consecuente “no activación” de los núcleos de salida y por lo tanto la libertad del tálamo ventrolateral para estimular a la corteza motora.

1.1.3 Participación de los Ganglios Basales en el control motor

Los Ganglios Basales proyectan hacia el tallo cerebral, y por lo tanto influyen en la excitabilidad de diversos centros de este, así como en sus funciones, por ejemplo, el control de movimiento sacádico de los ojos, el reflejo de parpadeo, la reacción de sobresalto, así como reflejos posturales y de locomoción (Obeso *et al.*, 2008a)

Además, se dice que la ejecución apropiada de los movimientos voluntarios resulta del correcto procesamiento de la información sensitiva y motora en el cerebro, función que recae en la corteza cerebral, tálamo y en los Ganglios Basales (Blandini *et al.*, 2000).

1.1.4 Patologías de los Ganglios Basales

Los trastornos de los Ganglios Basales humanos están asociados con una gran cantidad de fenómenos clínicos que van desde exceso de movimiento incontrolable hasta la restricción del movimiento propio del parkinsonismo. Los neurólogos clasifican estos padecimientos como desórdenes de movimiento.

Dichos desórdenes de movimientos se han clasificado en tres categorías:

INTRODUCCIÓN

1. Desórdenes hipercinéticos: Se caracterizan por un exceso de movimiento con acciones motoras rápidas y relativamente incontrolables intercaladas en la actividad motora normal. Farmacológicamente son suprimidos mediante la administración de antagonistas dopaminérgicos D₂ y se agravan con la administración de agonistas dopaminérgicos. La enfermedad de Huntington es el desorden hipercinético más común (Albin *et al.*, 1989).
2. Desórdenes hipocinéticos: Caracterizados por acinesia (falta de movimiento), bradicinesia (movimientos lentos y dificultosos) y rigidez.
La enfermedad de Parkinson es el desorden hipocinético prototípico y se caracteriza por la lentitud en los movimientos, tono muscular incrementado, pausas en movimientos espontáneos y temblor en reposo (Albin *et al.*, 1989)
3. Distonia: Consiste en asumir posturas corporales inusuales y espontáneas que pueden durar segundos o minutos. Puede afectar músculos branquiales, axiales o de las extremidades. Se conoce muy poco de la fisiopatología de la distonia (Fahn, 1987).

1.1.4.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD) es un desorden progresivo y neurodegenerativo que provoca la pérdida gradual de la capacidad de ejecución de movimientos voluntarios.

La patología de la enfermedad comprende la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (Blandini *et al.*, 2000).

Lo anterior provoca una reducida activación de los receptores dopaminérgicos llevando a la sobreactivación de la vía indirecta y a la activación disminuida de la vía directa (Obeso *et al.*, 2000) (Fig. 4).

Esto es, se observa un aumento en el disparo (y consecuente liberación de neurotransmisores) en el núcleo subtalámico y en los núcleos de salida, mientras que el globo pálido externo reduce su actividad (Galvan and Wichmann, 2008).

INTRODUCCIÓN

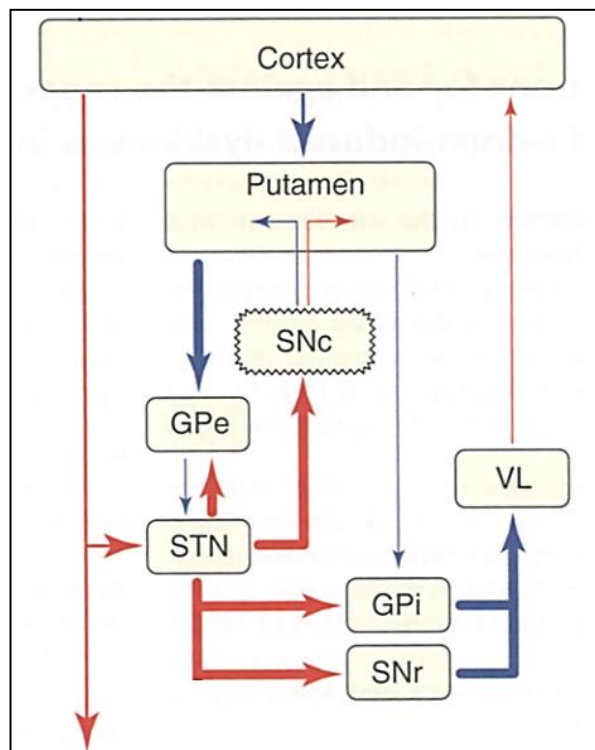


Figura 4. Esquema del modelo clásico de los ganglios basales en estado parkinsoniano. Las flechas azules indican proyecciones inhibitorias y las flechas rojas indican proyecciones excitatorias. El grosor de las flechas indica el grado de activación de cada proyección. En el estado parkinsoniano, la depleción dopaminérgica conduce a la desinhibición de las neuronas estriatales de la vía indirecta, teniendo como consecuencia una incrementada inhibición del Globo Pálido externo (GPe) y la desinhibición del Núcleo Subtalámico (STN). La resultante sobreactivación de las neuronas del STN conduce a un exceso de excitación en las neuronas de la Sustancia Nigra reticulada y Globo Pálido interno (GPi/SNr) y una sobreinhibición de los centros motores tálamo-corticales (Modificado de Obeso *et al.*, 2000).

Las causas de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas no son del todo conocidas, sin embargo se sugieren defectos mitocondriales congénitos o producidos por exposición a químicos; estrés oxidativo originado por el metabolismo de la dopamina y neuromelanina en las neuronas nigrales; toxicidad glutamatérgica debido al constante flujo del neurotransmisor excitatorio en la SNc proveniente del núcleo subtalámico; o factores genéticos (Blandini *et al.*, 2000).

Respecto a los factores genéticos, se identifican mutaciones -en el cromosoma 4- en el gen que codifica para la proteína α -sinucleína (reguladora negativa de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima involucrada en la producción de dopamina) como factores de riesgo que condicionan la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. (Polymeropoulos *et al.*, 1997).

INTRODUCCIÓN

La proteína mutada adquiere conformaciones anómalas y se condensa en los llamados “cuerpos de Lewy”, además, se tiene un aumento de la producción de dopamina. Ambos factores contribuyen a la muerte neuronal (Gasser *et al.*, 1997).

El tratamiento de primera línea es la L-3-4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que se denomina “terapia de reemplazo”, pues este precursor de la dopamina, actúa justamente reemplazándola dentro del sistema de los Ganglios Basales (Huot *et al.*, 2013).

No obstante, debido a la sensibilización de los receptores dopaminérgicos D₁ en las neuronas de la vía directa y la activación aberrante de esta, la repetida administración de la L-DOPA puede inducir discinecias (movimientos involuntarios anormales) (Gerfen and Surmeier, 2011).

1.2 DOPAMINA Y RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Los diversos estudios neuropsicológicos del papel de la dopamina en el sistema nervioso central han evolucionado desde el punto de vista simple en el que esta se tomaba solo como señalizadora en procesos de recompensa, hacia situaciones más complejas en las cuales la dopamina participa en la fisiopatología de padecimientos como la enfermedad de Parkinson, el desorden de déficit de atención con hiperactividad y la esquizofrenia (Iversen and Iversen, 2007).

Se reconocen cuatro vías dopaminérgicas mayores en el cerebro de los mamíferos: la nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

1.2.1 Dopamina

La dopamina (DA) es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el cerebro de los mamíferos, donde controla una gran variedad de funciones incluyendo la actividad locomotora, procesos cognitivos, emociones, reforzamiento positivo, ingesta de alimento y regulación endócrina. También participa en diversos procesos periféricos como modulador de la función cardiovascular, liberación de otras catecolaminas, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale *et al.*, 1998).

INTRODUCCIÓN

1.2.1.1 Síntesis y liberación

La tirosina se considera el punto inicial en la biosíntesis de dopamina y una vez que entra a las neuronas dopaminérgicas mediante transportadores de aminoácidos de alta afinidad, es convertida a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima citoplasmática tirosina hidroxilasa (TH), este es el paso limitante de la síntesis de dopamina.

Posteriormente -también en el citosol- la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC, también llamada dopa descarboxilasa) cataliza la conversión de L-DOPA (Fig. 5) (Elsworth and Roth, 1997).

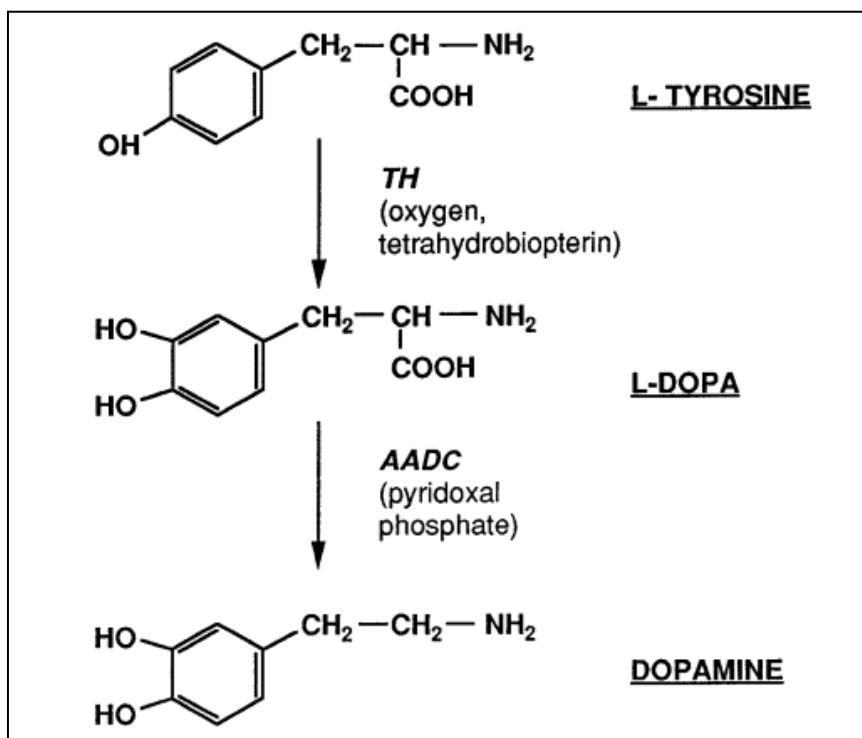


Figura 5. Biosíntesis de dopamina. Las enzimas involucradas son la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC). Los cofactores para cada enzima se muestran entre paréntesis, oxígeno y tetrahidrobiopterina para la TH; y fosfato de piridoxal para la AADC (Tomado de Elsworth and Roth, 1997).

La DA recién sintetizada es transportada a vesículas de almacenaje -mediante transportadores vesiculares (VMATs)- en concentraciones aproximadas de 0.1 M, de donde será liberada mediante exocitosis en respuesta a un potencial de acción y consecuente influjo de calcio a la célula (Fig. 6). La liberación es dependiente del patrón de disparo neuronal y puede ser tanto axonal como dendrítica (Bloom *et al.*, 1995)

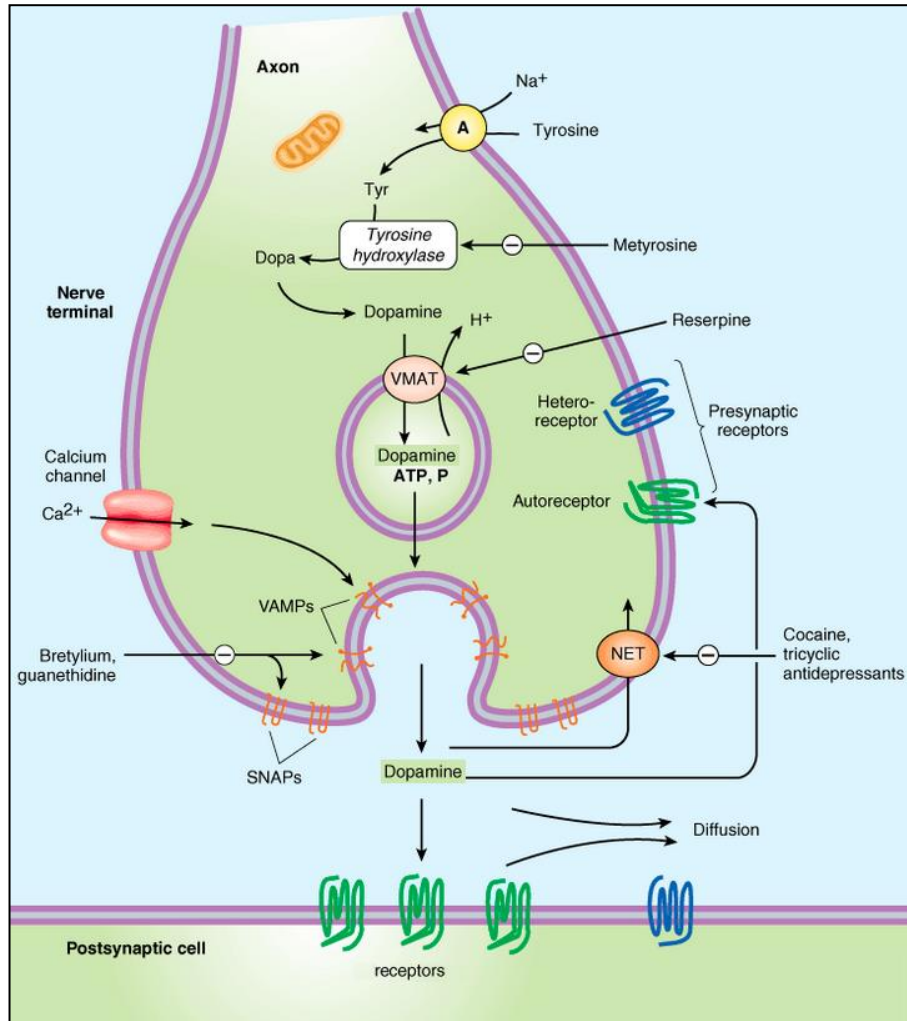


Figura 6. Liberación sináptica de dopamina. El aminoácido tirosina entra a la célula vía simporte con Na^+ , sirviendo como sustrato para la síntesis de dopamina (DA). Una vez sintetizada, esta es vesiculada por medio de transportadores vesiculares (VMATs). Cuando un potencial de acción produce la entrada de calcio a la terminal, las vesículas se fusionan a la membrana, liberando el neurotransmisor al espacio sináptico donde puede actuar en receptores dopaminérgicos en la célula postsináptica, en autorreceptores o ser recapturada por el transportador de dopamina (DAT). Puede bloquearse la síntesis de DA con metirosina, su vesiculación con reserpina o su recaptura con cocaína o antidepresivos tricíclicos.

1.2.1.2 Metabolismo

Las enzimas responsables de la degradación de dopamina son la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La primera se encuentra tanto en neuronas dopaminérgicas como en células gliales, por lo que el metabolito que forma, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) puede encontrarse en ambos sitios. Por otra parte, la COMT solo se encuentra al interior de células gliales o neuronas postsinápticas en

INTRODUCCIÓN

referencia a la neurona dopaminérgica; de tal manera, el metabolito que esta enzima cataliza, el ácido homovanílico (HVA), solo se encontrará en dichas células (Fig. 7) (Elsworth and Roth, 1997).

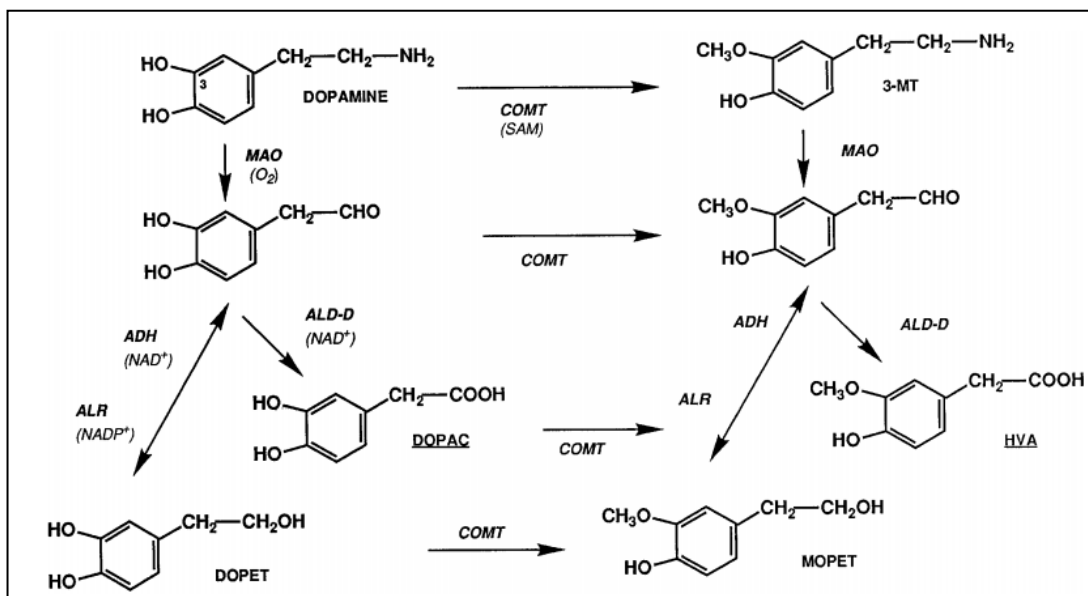


Figura 7. Principales mecanismos catabólicos de la dopamina. Las enzimas involucradas son la monoamino oxidasa (MAO), catecol-O-metiltransferasa (COMT), aldehído deshidrogenasa (ALD-D), aldehído reductasa (ALR) y alcohol deshidrogenasa (ADH). Los cofactores para cada enzima se muestran entre paréntesis; SAM, S-adenosil-L-metionina. Los metabolitos mostrados son 3-metoxitiramina (3-MT); ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC); ácido homovanílico (HVA); 3,4-dihidroxifeniletanol (DOPET); 3-metoxi-4-hidroxifeniletanol (MOPET). Además, la dopamina y sus metabolitos son sustratos para la fenolsulfotransferasa, la sulfatación ocurre en la posición 3, indicada en la estructura de la dopamina. En el cerebro, la dopamina se metaboliza principalmente a metabolitos ácidos (DOPAC y HVA, subrayados), con menor formación de metabolitos alcohólicos (DOPET y MOPET); periféricamente los metabolitos alcohólicos pueden ser metabolizados además por la alcohol deshidrogenasa; además la glucoroniltransferasa puede formar conjugados glucoronados de dopamina y sus metabolitos (Tomado de Elsworth and Roth, 1997).

INTRODUCCIÓN

1.2.2 Receptores Dopaminérgicos

La dopamina media sus efectos neurales a través de receptores tanto presinápticos como postsinápticos. Se han identificado cinco tipos de estos receptores, todos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) (Fig. 8). Basados en sus propiedades farmacológicas y de señalización, además de su estructura, los receptores dopaminérgicos se han subdividido en dos familias: la familia del tipo D₁ (también llamada “D₁-like”) que comprende a los receptores D₁ y D₅; y la familia del tipo D₂ (o “D₂-like”) que comprende a los receptores D₂, D₃ y D₄ (Holmes *et al.*, 2004).

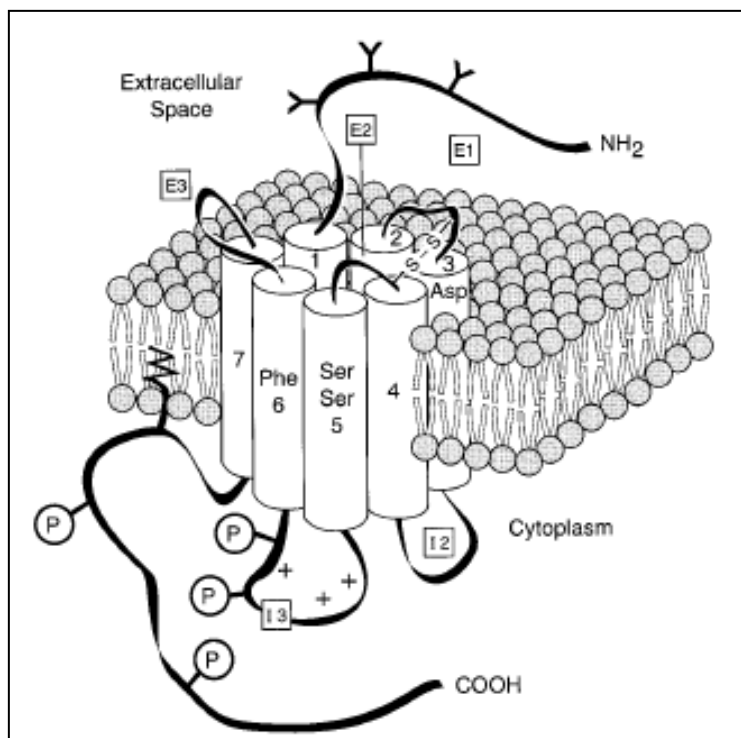


Figura 8. Estructura del receptor para dopamina. Se presentan las características estructurales de los receptores de la familia D₁. Los receptores de la familia D₂ se caracterizan por tener un extremo –COOH terminal más corto y la tercer asa intracelular más larga. Los residuos involucrados en la unión a la dopamina se resaltan en los dominios transmembranales. Los sitios potenciales de fosforilación se representan en la tercer asa intracelular y en el extremo –COOH terminal. Sitios potenciales de glicosilación se representan en el extremo –NH₂ terminal. E1-E3, asas extracelulares; 1-7, dominios transmembranales; I2-I3, asas intracelulares (Tomado de Missale *et al.*, 1998).

INTRODUCCIÓN

1.2.2.1 Familia D₁

La familia de receptores dopaminérgicos D₁ se encuentra conformada por los receptores D₁ y D₅, que poseen aproximadamente un 80% de homología en sus regiones transmembranales (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

Su tercer asa intracelular y su extremo -COOH terminal son similares en tamaño, variando solo la secuencia aminoacídica. Por otra parte, las asas citoplasmáticas pequeñas 1 y 2 están altamente conservadas (Missale *et al.*, 1998).

En el cerebro, los receptores D₁ están altamente expresados en las áreas nigro-estriatal, mesolímbica y mesocortical, en particular el estriado, núcleo accumbens, sustancia nigra, bulbo olfatorio, amígdala y corteza frontal; también en las porciones inferiores del hipocampo y cerebelo (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

Por su parte, los receptores D₅ se expresan en bajos niveles en neuronas piramidales de la corteza prefrontal, sustancia nigra, hipotálamo, hipocampo y el giro dentado (Missale *et al.*, 1998).

Aunque ambos receptores se expresan en las neuronas espinosas medianas (MSNs, por sus siglas en inglés) del estriado, solo los D₁ son transportados a las terminales estriato-nigrales (Missale *et al.*, 1998).

Los receptores de la familia D₁ no participan como autorreceptores.

En los circuitos de los ganglios basales se encuentran en las aferentes estriato-nigrales y subtálamo-nigrales (Bordet *et al.*, 2000).

Mientras que los agonistas de los receptores de la familia D₁ producen hiperactividad, el antagonismo de dichos receptores produce el efecto contrario, la disminución del movimiento. Se ha encontrado (Xu *et al.*, 1994; Sibley, 1999) que ambos efectos son abolidos en ratones KO para el D₁R.

1.2.2.2 Familia D₂

1.2.2.2.1 Receptores D₂

Existen dos variantes –derivadas de *splicing* alternativo- principales del receptor D₂ que han sido denominadas D₂S (D₂ corto, por su sigla en inglés) y D₂L (D₂ largo, por su sigla en inglés), teniendo esta última una inserción de 29 aminoácidos en la tercer asa intracelular (Giros *et al.*, 1989; Monsma *et al.*, 1989). El receptor D₂S posee una mayor participación

INTRODUCCIÓN

de manera presináptica como autorreceptor, mientras que el D₂L parece ser predominantemente postsináptico (De Mei *et al.*, 2009).

La mayor expresión del receptor D₂ se encuentra en el estriado, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio. También se expresa significativamente en la sustancia nigra, área ventral tegmental, hipotálamo, áreas corticales, séptum, amígdala e hipocampo (Missale *et al.*, 1998).

Los ratones KO para este receptor exhiben diversos impedimentos neurológicos, además presentan hipoactividad, marcha y movimientos lentos, postura anormal e inhabilidad para reproducirse. También pueden presentar inmovilidad o falta de coordinación motora (Sibley, 1999).

Dentro de los circuitos de los ganglios basales se encuentran tanto en el soma como en las terminales del estriado hacia el globo pálido externo, así como en aferentes subtálamo-palidales (Hernandez *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Receptores D₃

Este receptor posee un 75% de homología con respecto al receptor D₂, en sus dominios transmembranales (Missale *et al.*, 1998). Se han descrito isoformas de este receptor, demostrándose como no funcionales (Giros *et al.*, 1991).

La variante más importante, funcionalmente hablando, es la denominada D_{3nf} (D₃ no funcional, por sus siglas en inglés), que presenta una secuencia de aminoácidos distinta en el extremo -COOH terminal, además de que no contiene los dominios transmembranales 6 y 7. Se ha demostrado que puede formar heterodímeros con la isoforma no truncada del receptor, reduciendo la afinidad de este por su ligando endógeno (Elmhurst *et al.*, 2000). Así mismo, dicha isoforma es capaz de secuestrar a los receptores D₃ funcionales en el citoplasma, impidiendo su anclaje a la membrana y consecuente señalización (Karpa *et al.*, 2000).

El ARN_m de la isoforma D_{3nf} es tan abundante como el de la isoforma no truncada, además de que se encuentra en las mismas regiones cerebrales (Liu *et al.*, 1994). La mayor expresión se observa en las áreas límbicas, como el núcleo accumbens *shell* o el tubérculo olfatorio. También se encuentra en menores cantidades en el estriado, la sustancia nigra pars compacta, el área ventral tegmental (VTA) y el hipocampo (Missale *et al.*, 1998).

INTRODUCCIÓN

El receptor D₃ también actúa como autorreceptor en las neuronas dopaminérgicas, regulando la liberación de dopamina (Sokoloff *et al.*, 1990; Tepper *et al.*, 1997).

En los ganglios basales, se encuentran en aferentes subtálamo-nigrales, junto con receptores D₁ localizados en las mismas aferentes, modulando la entrada glutamatérgica a la SNr. Fisiológicamente ambos receptores (D₁ y D₃) pueden actuar simultáneamente para modular dinámicamente y en tiempo real, la información de salida de los ganglios basales (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006).

1.2.2.2.3 Receptores D₄

Es el receptor con la menor homología con respecto al resto en la familia D₂ (apenas un 53% con respecto al receptor D₂). Existen variaciones polimórficas con inserciones en la tercera asa intracelular que pueden ir desde 2 hasta 11 repeticiones de la misma secuencia de 16 aminoácidos. La forma con 4 repeticiones (D_{4.4}) es la más común en humanos (60%), mientras que las isoformas D_{4.7} y D_{4.2}, están presentes en 14 y 10% de la población, respectivamente (Cohen *et al.*, 1999). Aunque la relevancia funcional de las variantes no ha sido elucidada, la variante D_{4.7} ha sido relacionada con la aparición del síndrome de déficit de atención con hiperactividad (ADHD, por sus siglas en inglés) (LaHoste *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 2005).

El receptor D₄ es el receptor dopaminérgico con menor expresión en el cerebro, con expresión documentada en la corteza frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, globo pálido, sustancia nigra pars reticulata y tálamo (Missale *et al.*, 1998).

El único lugar dentro de los ganglios basales donde este receptor es expresado es en el GPe, tanto en el soma como en las terminales de este dirigidas hacia el núcleo subtalámico y sustancia nigra reticulada (Mrzljak *et al.*, 1996; Ariano *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 1998).

Los receptores D₄ localizados en las proyecciones pálido-nigrales reducen la liberación de GABA a la SNr (Acosta-Garcia *et al.*, 2009), así como la actividad motora al ser activados (Erlj *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN

1.2.3 Señalización

Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Los GPCRs consisten de 7 estructuras transmembranales de forma helicoidal, con un extremo extracelular N-terminal y un extremo intracelular COOH-terminal. La transducción de señales inicia cuando un ligando (agonista) extracelular se une al receptor y cambia su conformación de un estado inactivo a uno activo (Vilardaga *et al.*, 2009). Todas las acciones celulares relacionadas con los GPCRs están mediadas por 16 tipos de proteínas G heterotriméricas, clasificadas en 4 familias $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$. En general las proteínas G están conformadas por 3 subunidades asociadas: α , β y γ (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Sin la presencia de un ligando, la subunidad α posee guanina difosfato (GDP) en su sitio de unión a nucleótidos, y está altamente asociada al complejo $\beta\gamma$, formando así una proteína trimérica inactiva. Cuando un agonista se une al receptor, este actúa como GEF (Factor intercambiador de nucleótidos de guanina, por sus siglas en inglés) promoviendo el intercambio de GDP por guanina trifosfato (GTP) en la subunidad α , liberando con esto al complejo $\beta\gamma$; tanto α como $\beta\gamma$ pueden transducir la señal activando ciertos efectores (Fig. 9) (Pierce *et al.*, 2002).

La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α es acelerada por proteínas llamadas RGS (reguladoras de la señalización de proteínas G), con lo que el GTP es hidrolizado a GDP, induciendo la consecuente reasociación del trímero ahora inactivo (Wess, 1997).

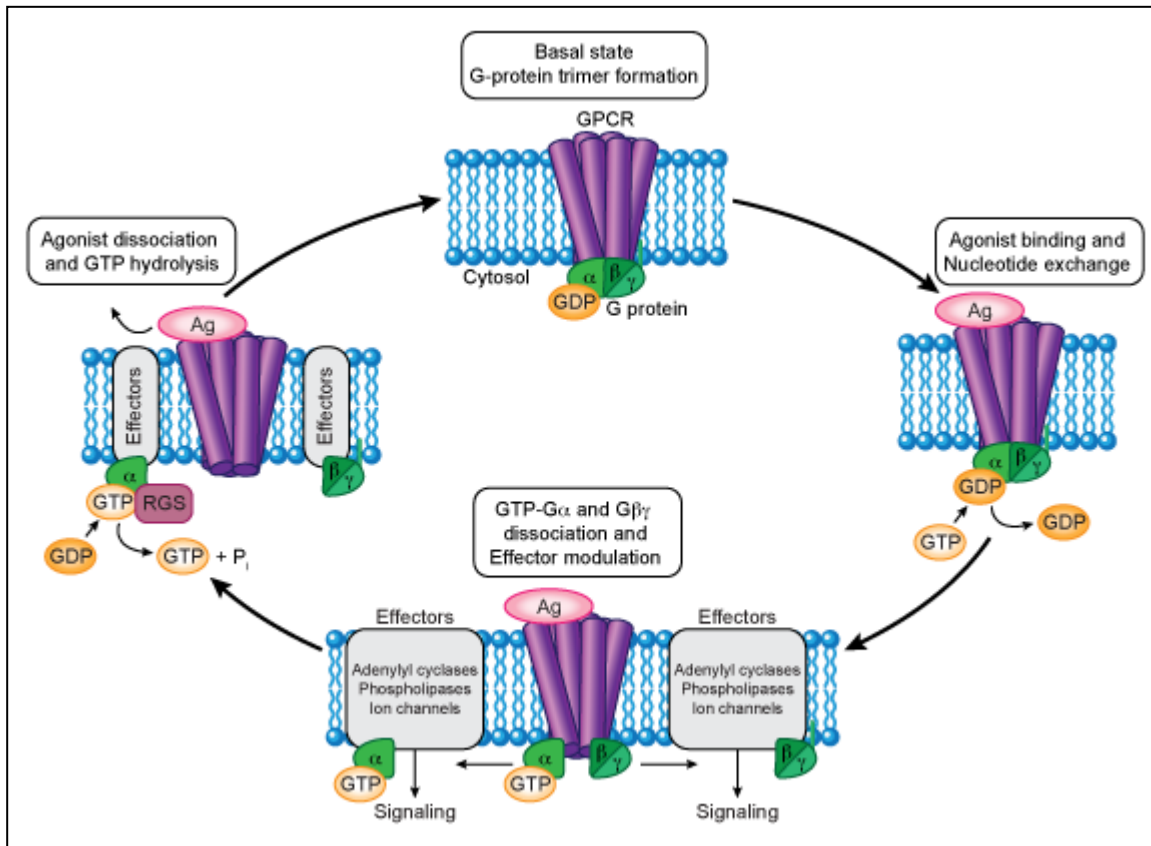


Figura 9. Ciclo de activación-inactivación de las proteínas G. En estado basal, la subunidad $\beta\gamma$ se encuentra unida a la subunidad α , y esta última posee unido GDP. Cuando el ligando se une a su receptor, este cambia su conformación, promoviendo el intercambio de GDP por GTP y la disociación de ambas subunidades, pudiendo cada una activar a sus efectores por separado. Las proteínas RGS promueven la actividad de GTPasa de la subunidad α , produciéndose la hidrólisis de GTP a GDP, recobrando a su vez la asociación con la subunidad $\beta\gamma$ y regresando así al estado basal.

Los efectores de las diferentes subunidades α son diversos, sin embargo los de mayor relevancia se detallan a continuación:

- $G_{as} \rightarrow$ Activa a la adenilato ciclasa (Rodbell *et al.*, 1971), canales de Ca^{++} y cinasas de tirosina de la familia de Src (Ma *et al.*, 2000).
- $G_{ai} \rightarrow$ Inhibe a la adenilato ciclasa (Bokoch *et al.*, 1984; Katada *et al.*, 1984).
- $G_{aq} \rightarrow$ Activa a la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$) (Smrcka *et al.*, 1991).
- $G_{\alpha12/13} \rightarrow$ Activa RhoGEFs para la formación de fibras de estrés (Kozasa *et al.*, 1998).

Por su parte $G_{\beta\gamma}$ activa canales de K^+ rectificadores (GIRK), a la PI3K e inactiva canales Ca^{++} (Logothetis *et al.*, 1987).

INTRODUCCIÓN

Cuando se tiene una estimulación constante del receptor por parte del ligando, se da lo que se conoce como “desensibilización” que inicia por la fosforilación del extremo -COOH terminal de este por cinasas como la PKA, PKC o GRK (cinasa de receptores acoplados a proteínas G (Pitcher *et al.*, 1998).

La fosforilación promueve el reclutamiento de β -arrestinas que interactúan con proteínas denominadas clatras, encargadas de rodear la porción de membrana a la que está anclado el receptor y sus proteínas G, para su internalización. La GTPasa dinamina “corta” la vesícula formada por las clatras para internalizar al receptor que puede ser reciclado o enviado a los lisosomas para su degradación (Santini *et al.*, 2002) (Fig. 10).

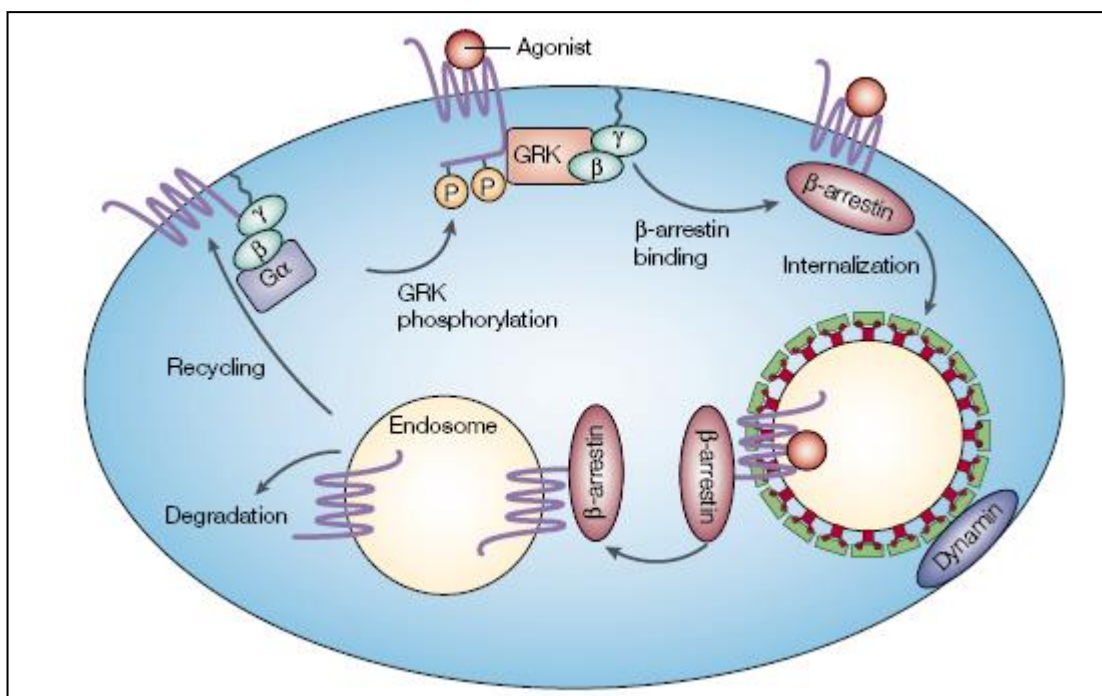


Figura 10. La activación de los GPCRs por su agonista conduce a la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$. El dímero $\beta\gamma$ libre recluta cinasas de GPCRs (GRKs) hacia el receptor donde fosforilan específicamente receptores ocupados por su ligando. Dicha fosforilación produce a su vez el reclutamiento de β -arrestinas y clatras. El receptor es internalizado en endosomas ácidos, donde es desfosforilado y devuelto a la membrana celular o degradado (Tomado de Pierce *et al.*, 2002).

1.2.3.1 Familia D₁

Tanto los receptores D₁ como los D₅ están acoplados a proteínas G_{os}, lo que conlleva la estimulación de la adenilato ciclasa y el consecuente aumento en la concentración de AMPc, no obstante, aunque la proteína G_{os} es prácticamente ubicua, existen regiones cerebrales como el estriado, núcleo accumbens o tubérculo olfatorio, que aunque poseen

INTRODUCCIÓN

abundante inervación dopaminérgica, expresan en baja proporción a la proteína $G_{\alpha s}$ pero donde la proteína $G_{\alpha olf}$ se encuentra abundantemente expresada. En estos núcleos, los receptores de la familia D_1 están acoplados a dicha proteína (altamente relacionada con $G_{\alpha s}$, llegando a una homología de 88% en la secuencia aminoacídica), conservándose la consecuencia funcional de activación de la adenilato ciclasa (Sidhu, 1998; Zhuang *et al.*, 2000).

El aumento de AMPc tras la activación de la adenilato ciclasa propicia la activación de la PKA, que tiene diferentes efectores. Los más importantes se detallan a continuación:

- DARPP32: La proteína DARPP32 (Fosfoproteína de 32 KDa regulada por AMPc y dopamina, por sus siglas en inglés) es una proteína de función dual altamente expresada en el estriado que inhibe a la proteína fosfatasa 1 (PP1), cuando ha sido fosforilada en la Thr34 por la PKA, o inhibe a la propia PKA cuando ha sido fosforilada en la Thr75 por la CDK5 (Bibb *et al.*, 1999).
- Canales iónicos: La PKA fosforila y activa directamente canales de Na^+ dependientes de voltaje, así como canales de Ca^{++} tipo L y P/Q.

Este efecto es particularmente importante, pues al activarse los canales de calcio, el influjo de este ión propicia la iniciación de potenciales de acción y la consiguiente liberación de neurotransmisores, otorgando a los receptores D_1 , su carácter de receptores excitatorios.

Así mismo, incrementa la actividad de los receptores NMDA fosforilando la subunidad NR1 de estos, y disminuye las corrientes de K^+ al estimular a los canales rectificadores de dicho ión (Neve *et al.*, 2004).

- CREB: La estimulación de los receptores D_1 induce la expresión de varios factores transcripcionales, muchos de los cuales dependen de la activación inicial de CREB. La fosforilación de CREB en la Ser133 por la PKA produce su activación (Liu and Graybiel, 1996).

Se ha demostrado que dentro de los ganglios basales, la activación de los receptores D_1 en las neuronas estriatales de la vía directa incrementa la excitabilidad de estas y la liberación de GABA a nivel presináptico en sus terminales, promoviéndose el movimiento (Floran *et al.*, 1990).

INTRODUCCIÓN

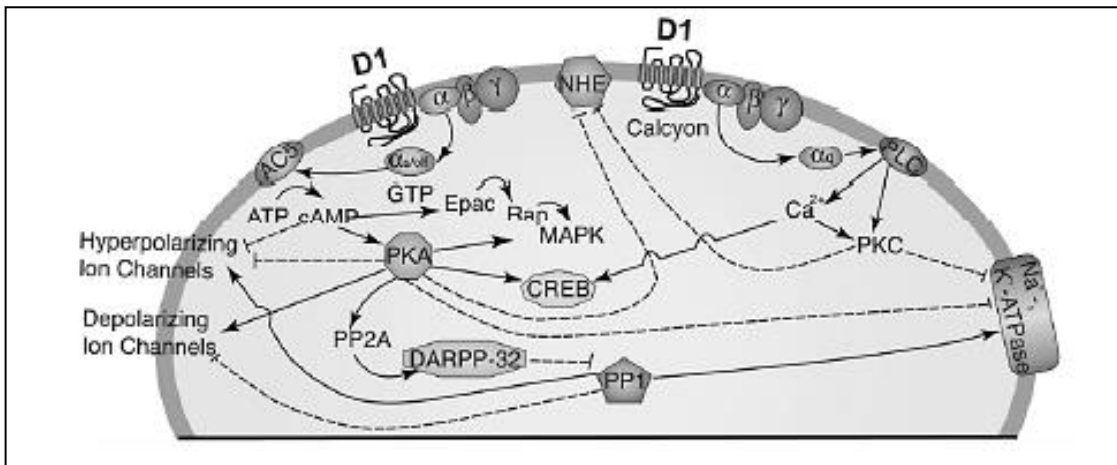


Figura 11. Vías de señalización de los receptores para dopamina de la familia D₁. Los efectos estimuladores se indican con una línea sólida con cabeza de flecha, los efectos inhibitorios se representan con líneas punteadas terminando en cabeza de barra (Tomado de Neve *et al.*, 2004).

1.2.3.2 Familia D₂

Los receptores de la familia D₂ están acoplados a proteínas G_{ai/o}, lo que conlleva la inhibición de la adenilato ciclasa al ser activados (De Camilli *et al.*, 1979; Stoof and Keibian, 1981).

Dicha inhibición produce la disminución en la producción de AMPc, y la consecuente “no activación” de la PKA. Entonces, la estimulación de los receptores de la familia D₂ producirá una disminución en la fosforilación de los sustratos de la PKA, por ejemplo, disminuirá la fosforilación en la Thr34 de DARPP32 e incrementará la fosforilación de dicha proteína en la Thr75 (Bibb *et al.*, 1999).

Otra respuesta potencialmente mediada por la activación de autorreceptores D₂ y la consecuente inhibición de la adenilato ciclasa, es la supresión de la actividad de tirosina hidroxilasa (TH), ya que dicha enzima requiere ser fosforilada en la Ser40 por la PKA para activarse (Lew *et al.*, 1999).

Muchas de las cascadas de señalización reguladas por la activación de receptores D₂-like, requieren de la participación del heterodímero βγ. Enseguida se detallan los principales efectores de dicha subunidad:

- Canales de K⁺: A diferencia del efecto producido por la activación de los receptores del tipo D₁, la estimulación de los receptores del tipo D₂, disminuye la excitabilidad neuronal mediante el aumento de corrientes de Potasio en la mayoría de las áreas

1.2.4 Farmacología de los receptores dopaminérgicos

Los receptores a dopamina en el cerebro son los blancos principales de los fármacos destinados al tratamiento de enfermedades como la de Parkinson, Huntington o esquizofrenia. Aunque los perfiles farmacológicos de ambas familias de receptores son sustancialmente distintos, la principal diferencia farmacológica correspondiente a cada subfamilia radica solamente en la diferente afinidad hacia agonistas o antagonistas específicos.

1.2.4.1 Familia D₁

Los receptores D₁ y D₅ poseen un alto grado de homología, por lo que debido a las casi idénticas afinidades por los ligandos, ha sido muy difícil diferenciarlos por medio de agonistas selectivos.

La diferencia más consistente se presenta con la propia dopamina, que posee una afinidad aproximadamente 10 veces mayor por el receptor D₅ en comparación al D₁ (Sunahara *et al.*, 1991).

Por otra parte, en cuanto a antagonistas se refiere, hasta hace algunos años, el (+) butaclamol resultaba ser el más específico, presentando afinidad ligeramente mayor por el receptor D₁ (Seeman and Van Tol, 1994). No obstante, recientemente se desarrolló el 4-Cloro-7-metil-5,6,7,8,9,14-hexahidrodibenz[*d,g*]azecin-3-ol, que posee una afinidad por el receptor D₅ en el rango de los picomoles; comparándose con la afinidad nanomolar que posee hacia el receptor D₁, por lo que puede considerarse el antagonista más selectivo hasta la fecha para diferenciar ambas subfamilias (Mohr *et al.*, 2006).

Con respecto a la diferenciación entre la familia D₁ y D₂, el agonista selectivo SKF 38393 y el antagonista selectivo SCH 23390, son los de uso común por excelencia debido a su alta afinidad por los receptores de la familia D₁ con respecto a la familia D₂ (casi cuatro órdenes de magnitud de diferencia) (Missale *et al.*, 1998) y a su fácil adquisición.

1.2.4.2 Familia D₂

Con respecto a los receptores que componen a la familia D₂, su diferenciación con respecto a aquellos en la familia D₁ se logra con relativa facilidad, ya que se cuenta con agonistas selectivos, entre los que se encuentra el quimpirol, con una afinidad aproximada de entre 5

INTRODUCCIÓN

y 50 nM por los receptores de la familia D₂, comparada con una afinidad en el rango micromolar para los receptores D₁. El sulpiride es el antagonista por excelencia para diferenciar ambas familias, pues es mucho más afín (dos órdenes de magnitud aproximadamente) por los receptores del tipo D₂ con respecto al tipo D₁ (Seeman and Van Tol, 1994; Missale *et al.*, 1998).

A diferencia del caso de las subfamilias del tipo D₁, las subfamilias del tipo D₂ son diferenciables entre sí. Enseguida se detallan los fármacos más utilizados para tal efecto.

1.2.4.2.1 Receptor D₂

Análisis del perfil farmacológico del receptor D₂ ha demostrado que las variantes corta y larga son prácticamente indistinguibles entre sí (Missale *et al.*, 1998), sin embargo, mediante el uso de antagonistas selectivos como el haloperidol ($K_i=1.2$ nM) o el nemonapride ($K_i=0.06$ nM), o agonistas selectivos como la (-)-Apomorfina ($K_i=0.7$ nM), es posible distinguir estos receptores de las otras subfamilias D₂ (Seeman and Van Tol, 1994).

1.2.4.2.2 Receptor D₃

El receptor D₃ es fácilmente distinguible de las otras dos subfamilias pues se cuenta con el 7-OH-DPAT, un agonista selectivo que es diez veces más afín por el receptor D₃ en comparación al D₂ y 650 veces más afín en comparación al receptor D₄ (Seeman and Van Tol, 1994). Aunado a este, el PD 128,907 es veinte veces más afín por el receptor D₃ en comparación al receptor D₂ y cien veces más afín con respecto al D₄ (Pugsley *et al.*, 1995). Por su parte, el antagonista GR 103691 posee una afinidad 100 veces mayor por el receptor D₃ en comparación al D₂ y D₄ (Audinot *et al.*, 1998), por lo que es el más utilizado en procedimientos experimentales.

1.2.4.2.3 Receptor D₄

Hasta antes de la síntesis de agonistas y antagonistas altamente selectivos para este receptor, la clozapina era utilizada como el antagonista más selectivo, sin que existiera un agonista para tal efecto (Seeman and Van Tol, 1994; Missale *et al.*, 1998), sin embargo, en la actualidad se cuenta con agonistas altamente selectivos como el WAY-100,365 (Chemel

INTRODUCCIÓN

et al., 2006) o el PD-168,077 (Glase *et al.*, 1997), que son aproximadamente 500 veces más selectivos hacia el receptor D₄ en comparación a los otros dos receptores de la familia D₂-like.

El antagonista L-745,870 (Bristow *et al.*, 1997) es el más utilizado por su alta selectividad, pues es 1000 veces más afín por el receptor D₄ en comparación al D₂ y D₃ (Glase *et al.*, 1997).

1.3 MICRODIÁLISIS Y HPLC

1.3.1 Microdiálisis Cerebral

La cuantificación del contenido de neurotransmisores puede realizarse con preparaciones cerebrales *ex vivo*. El análisis de las muestras homogenizadas permite obtener información respecto a la concentración de neurotransmisores y sus metabolitos, en estado estacionario. No obstante, este tipo de métodos no permite el estudio de la dinámica a corto plazo de dichas moléculas, además de arrojar resultados concernientes al contenido intracelular, principalmente.

Diversas técnicas han sido desarrolladas para permitir estudios dinámicos de la bioquímica del espacio extracelular y la sinapsis, por ejemplo, la incubación *in vitro* de rebanadas cerebrales, o la obtención de sinaptosomas o fracciones vesiculares.

La idea de la microdiálisis fue crear un “vaso sanguíneo artificial”, donde la difusión de las sustancias químicas se efectuara en dirección de la menor concentración. Las sustancias podrían ser recuperadas del espacio extracelular o introducidas dependiendo de la concentración relativa del líquido de perfusión. Dicho tráfico bidireccional permite realizar experimentos farmacológicos localizados (Ungerstedt and Hallstrom, 1987).

La microdiálisis involucra la implantación de una cánula guía en un área cerebral determinada mediante cirugía estereotáxica y la posterior introducción a través de esta de una cánula de microdiálisis. La sonda incluye en su extremo una membrana semipermeable que será perfundida continuamente con solución fisiológica (0.5 - 4 $\mu\text{L}/\text{min}$), permitiendo esta la transferencia de masa por gradiente de concentración, dependiente del peso molecular (5-100 KDa) y polaridad; las moléculas pueden difundir libremente desde el líquido de perfusión a través de la membrana hacia el espacio extracelular (el caso de los

INTRODUCCIÓN

fármacos administrados) o del medio extracelular hacia el líquido de perfusión (neurotransmisores, por ejemplo), que será recuperado como dializado y analizado (Justice, 1993; Guihen and O'Connor, 2009) (Fig. 13).

Existen diversas ventajas que posicionan a la microdiálisis como una de las técnicas más utilizadas en el campo de las neurociencias; en primer término, permite monitorear el cambio de concentraciones extracelulares de neurotransmisores en respuesta a estímulos o fármacos, en un animal vivo en libre movimiento, por varios días incluso y con una baja carga de estrés para el animal. Además, no perturba la homeostasis del tejido al no movilizar proteínas o enzimas ni valerse de grandes pérdidas o ganancias de fluidos; la membrana semipermeable protege al tejido de infecciones exógenas y la resolución temporal es permite muestrear pequeñas áreas del cerebro durante experimentos conductuales. No se requiere purificación de los dializados tras su obtención, por lo que pueden ingresarse directamente a dispositivos de cuantificación (principalmente cromatógrafos de líquidos de alta resolución) (Fig. 13) (Anderzhanova and Wotjak, 2013).

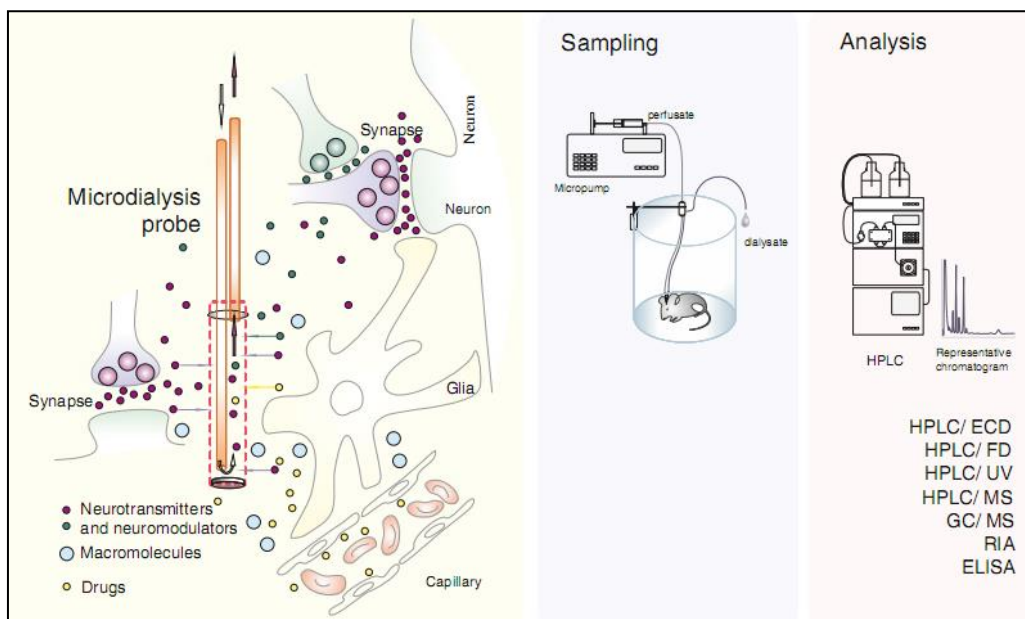


Figura 13. Microdiálisis cerebral. El panel de la izquierda muestra esquemáticamente la interacción entre la membrana de diálisis y el tejido. El flujo de líquido dentro de la cánula permite difundir los fármacos al espacio extracelular y coleccionar las moléculas que se encuentran en este. Tras coleccionar los dializados, pueden someterse a diversos tipos de análisis. (Tomado de Anderzhanova and Wotjak, 2013).

INTRODUCCIÓN

1.3.2 HPLC

Para seleccionar un método de separación y cuantificación, diversos aspectos deben ser considerados, por ejemplo, la baja concentración de metabolitos presentes en los dializados, por lo cual, la técnica debe ofrecer límites de detección por encima de la menor concentración esperada en los dializados, además de ser lo suficientemente eficiente para separar los componentes de interés en la muestra.

La técnica de HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés) se utiliza frecuentemente para analizar las muestras provenientes de experimentos de microdiálisis pues permite separar e identificar los componentes de la muestra aun cuando estos se encuentran en concentraciones tan bajas como picrogramos.

En general, el método involucra una muestra líquida que es arrastrada a través de un adsorbente sólido empacado en una columna (fase estacionaria, generalmente un sólido granulado como sílica con polímeros como C18 en su superficie), mediante el flujo constante de una solución adecuada para tal efecto llamada fase móvil, que en términos generales contiene agua y disolventes como metanol, acetonitrilo, etc, en diferentes proporciones (Pinkerton, 1991).

Cada analito interactúa de manera distinta con la fase estacionaria y la fase móvil, dependiendo de su estructura química, peso molecular, polaridad, entre otros parámetros, por lo que si la interacción es débil, el tiempo para que la muestra abandone la columna por el extremo opuesto al que fue inyectada, será corto; por el contrario, si la interacción es intensa, el llamado tiempo de retención será mayor, dándose así la separación de los diferentes componentes de la muestra (Pinkerton, 1991).

La técnica de HPLC se diferencia de la cromatografía tradicional en las presiones de operación alcanzadas (hasta 3500-4000 psi); cantidad tan pequeña de muestra utilizada, que oscila entre 5 y 50 μL según el equipo y el diámetro de las columnas (2.1-4.6 mm, generalmente), lo que permite que se eficiente la separación de analitos.

Una vez que la muestra ha sido separada, cada componente debe analizarse para conocer su naturaleza, por lo que los dispositivos cromatográficos incluyen detectores con fundamentos distintos: detección con luz UV, detección fluorométrica, detección electroquímica, o incluso espectroscopia de masas.

INTRODUCCIÓN

En seguida se detalla brevemente el fundamento de la detección electroquímica y fluorométrica, por ser las utilizadas en el presente trabajo.

1.3.2.1 Detección Electroquímica (HPLC/ECD)

La muestra eluída por la fase móvil, pasa en forma de una capa muy delgada sobre la celda de detección, que posee un electrodo de referencia a un voltaje fijo establecido. Este paso provoca que la muestra sea oxidada o reducida. Si el potencial es mayor al necesario para oxidar o reducir la muestra, se produce un voltaje que pasa entre el electrodo y el soluto; la corriente resultante es directamente proporcional a la concentración del analito (Fig. 14).

La composición de la fase móvil es crítica, pues se requiere una transferencia de electrones entre esta y el electrodo para oxidar o reducir el analito (Zapata *et al.*, 2013).

Este tipo de detección es ampliamente utilizado en la cuantificación de Catecolaminas, ya que estas pueden ser oxidadas fácilmente.

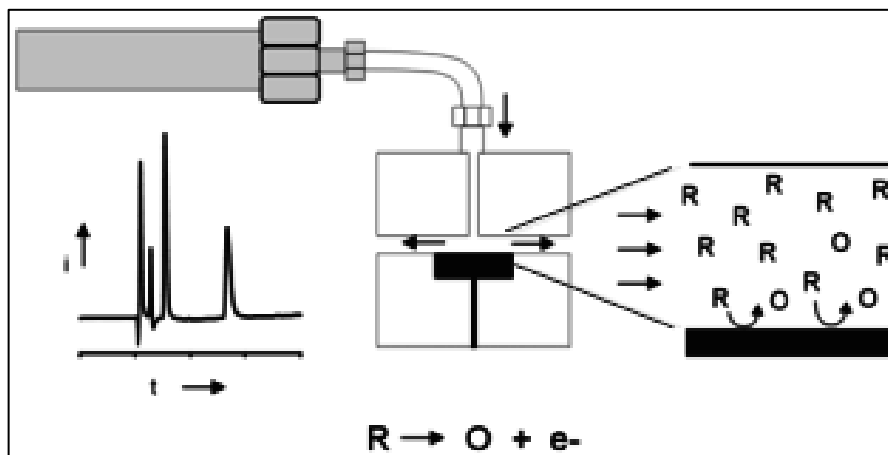


Figura 14. Fundamento de la detección electroquímica. La muestra en estado reducido es oxidada en la superficie del electrodo de referencia. La diferencia de potencial resultante de esta oxidación es medida en el electrodo de trabajo, siendo la corriente proporcional a la concentración del analito.

1.3.1.2 Detección fluorométrica (HPLC/FD)

En la detección fluorométrica, cuando la muestra pasa por la celda de detección, se hace incidir sobre esta un haz de luz de longitud de onda fija, establecida previamente en base a la estructura molecular del analito. Dicha longitud de onda excitará al analito y producirá que este emita la energía absorbida en forma también de luz, de una longitud de onda distinta a la inicial.

INTRODUCCIÓN

El detector se ajusta para solo detectar la luz emitida por la muestra, ignorando cualquier otra interferencia. La cantidad de luz cuantificada será directamente proporcional a la concentración del analito (Zapata *et al.*, 2013).

Generalmente, este tipo de detecciones de utilidad para muestras que contienen aminoácidos, pero estos deben hacerse reaccionar previamente (derivatizar) con o-ftalaldehído (OPA) y 2-β-mercaptoetanol en solución acuosa a pH alcalino. La reacción produce isoindoles derivados de los aminoácidos originales, altamente fluorescentes y susceptibles de ser medidos (Fig. 15).

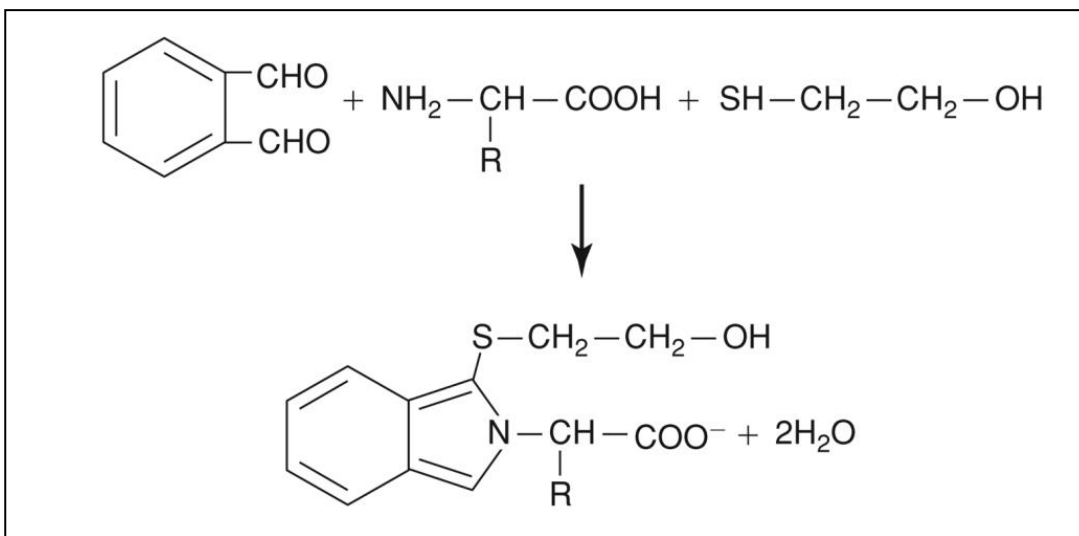


Figura 15. Reacción de derivatización. El o-ftalaldehído (OPA) reacciona con la amina primaria del aminoácido en presencia de 2-β-mercaptoetanol para formar un isoindol que puede ser medido mediante detección fluorométrica (Tomado de Zapata *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

2.1 Interacción entre los neurotransmisores dopamina, glutamato y GABA en la sustancia nigra pars reticulata

Existe evidencia de que la DA y GLU pueden interactuar tanto presináptica como postsinápticamente en varias regiones de los ganglios basales, modulando funciones cognitivas y motoras (Carlsson and Carlsson, 1990; Riederer *et al.*, 1992; Amalric *et al.*, 1994).

En particular, es conocido que existen fibras glutamatérgicas corticales y del núcleo subtalámico que hacen sinapsis directa en el complejo somato-dendrítico de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (Smith *et al.*, 1996). Al respecto, estudios en rebanadas de sustancia nigra, demostraron que tanto el L-GLU (Marien *et al.*, 1983), como agonistas selectivos y no selectivos de receptores ionotrópicos NMDA (Araneda and Bustos, 1989) estimularon la liberación dependiente de Ca^{++} de [3H]DA.

En relación a los estudios *in vivo*, experimentos de microdiálisis en la SNr, mostraron que la estimulación del núcleo subtalámico con carbacol dio lugar a un aumento de dopamina, pero interesantemente, también se observó un aumento de GABA y GLU (Fig. 16) (Rosales *et al.*, 1997).

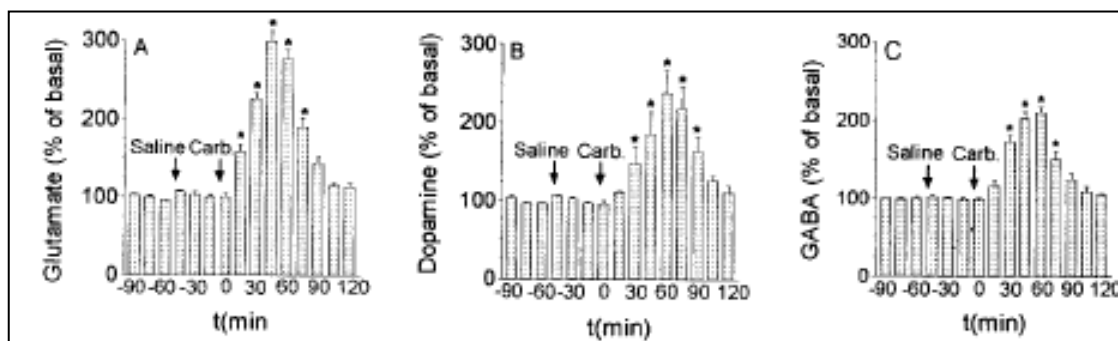


Figura 16. Efecto del carbacol ($1\mu\text{g}/0.25\ \mu\text{L}$ de solución salina) inyectado en el núcleo subtalámico, sobre los niveles extracelulares de glutamato, dopamina y GABA en la sustancia nigra pars reticulata de la rata. Los dializados se colectaron en intervalos de 15 minutos. Los niveles extracelulares basales ($\text{fmol}/\mu\text{L}$) fueron los siguientes: glutamato, 545 ± 69 ; dopamina, 0.79 ± 0.20 , y GABA, 79.4 ± 8.8 . Cada barra representa el promedio \pm S.E.M. de cinco diferentes experimentos. * $P\leq 0.01$ vs el control. (Tomado de Rosales *et al.*, 1997).

ANTECEDENTES

Para confirmar que la liberación de DA es debida a la activación de receptores glutamatérgicos en las dendritas de la SNc, se añadió NMDA al medio de perfusión. Se observaron los mismos efectos, un aumento de dopamina, seguido de un aumento de GABA, e interesantemente también de glutamato (Fig. 17) (Rosales *et al.*, 1997).

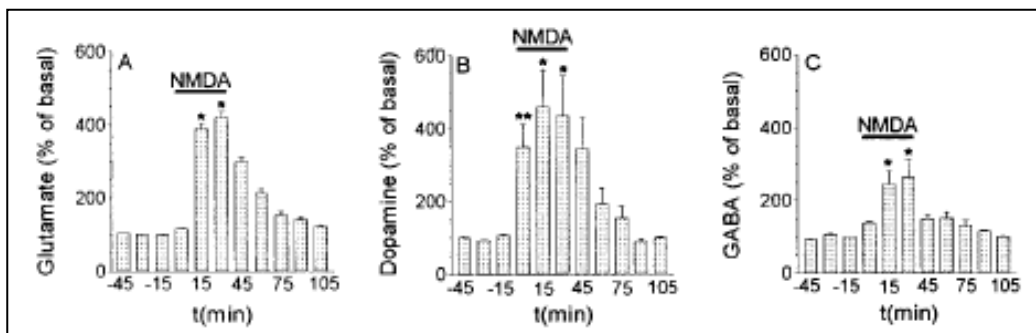


Figura 17. Efecto de la perfusión de N-metil-D-aspartato (1 mM) en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares basales de glutamato, dopamina y GABA. Los dializados se colectaron en intervalos de 15 minutos. El NMDA estuvo presente (línea horizontal) durante 45 minutos. Cada barra representa el promedio \pm S.E.M. de cinco diferentes experimentos. Los niveles extracelulares basales (fmol/ μ L) fueron los siguientes: glutamato, 584 ± 56 ; dopamina, 1.06 ± 0.26 , y GABA. 71.4 ± 8.5 . ** $P\leq 0.05$; * $P\leq 0.01$ vs el control. (Tomado de Rosales *et al.*, 1997).

Mientras la activación de receptores NMDA en las dendritas de la SNc da cuenta del aumento de dopamina, el aumento de GABA podría explicarse por la activación -ocasionada por el aumento de DA- de los receptores dopaminérgicos de tipo D_1 presentes en las aferentes estriato-nigrales (Altar and Hauser, 1987; Floran *et al.*, 1990; Gerfen *et al.*, 1995).

Para confirmar lo anterior, se perfundió el antagonista selectivo SCH 23390, que bloqueó el aumento de GABA observado (Fig. 18) (Rosales *et al.*, 1997).

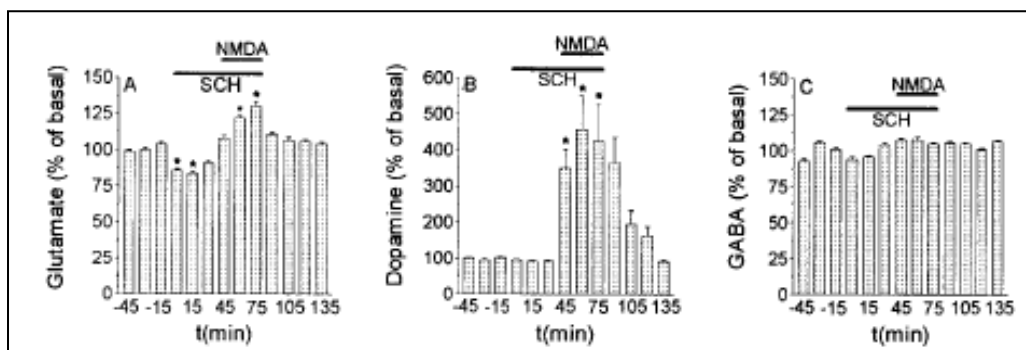


Figura 18. Efecto del SCH 23390 (100 μ M) sobre los incrementos de los niveles extracelulares basales de glutamato, dopamina y GABA inducidos por la perfusión de N-metil-D-aspartato, en la sustancia nigra pars reticulata de la rata. Los dializados se colectaron en intervalos de 15 minutos. El SCH estuvo presente durante 90 minutos (barra horizontal inferior) y 1 mM de NMDA (barra horizontal superior) durante 45 minutos. Cada barra representa el promedio \pm S.E.M. de cinco diferentes experimentos. Los niveles extracelulares basales (fmol/ μ L) fueron los siguientes: glutamato, 529 ± 62 ; dopamina, 1.25 ± 0.28 , y GABA. 80.2 ± 8.5 . * $P\leq 0.01$ vs el control. (Tomado de Rosales *et al.*, 1997).

ANTECEDENTES

El antagonista D₁, además de prevenir el aumento de GABA, también evitó el aumento de GLU, por lo que se presumió que dicho aumento también estaba mediado por la activación de receptores D₁ presentes en las aferentes subtálamo-nigrales (Savasta *et al.*, 1986a; Savasta *et al.*, 1986b; Besson *et al.*, 1988; Kreiss *et al.*, 1997; Flores *et al.*, 1999).

En resumen, el glutamato liberado por las aferentes subtálamo-nigrales, activaría receptores NMDA en las dendritas de la sustancia nigra compacta, provocando un aumento en la liberación de dopamina; dicha dopamina incrementaría la liberación de GABA mediante la activación de receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales, pero a su vez también ocasionaría una liberación “extra” del propio glutamato mediante la activación del mismo tipo de receptores dopaminérgicos en las aferentes subtálamo-nigrales, llegando así a un circuito de retroalimentación positiva (Fig. 19).

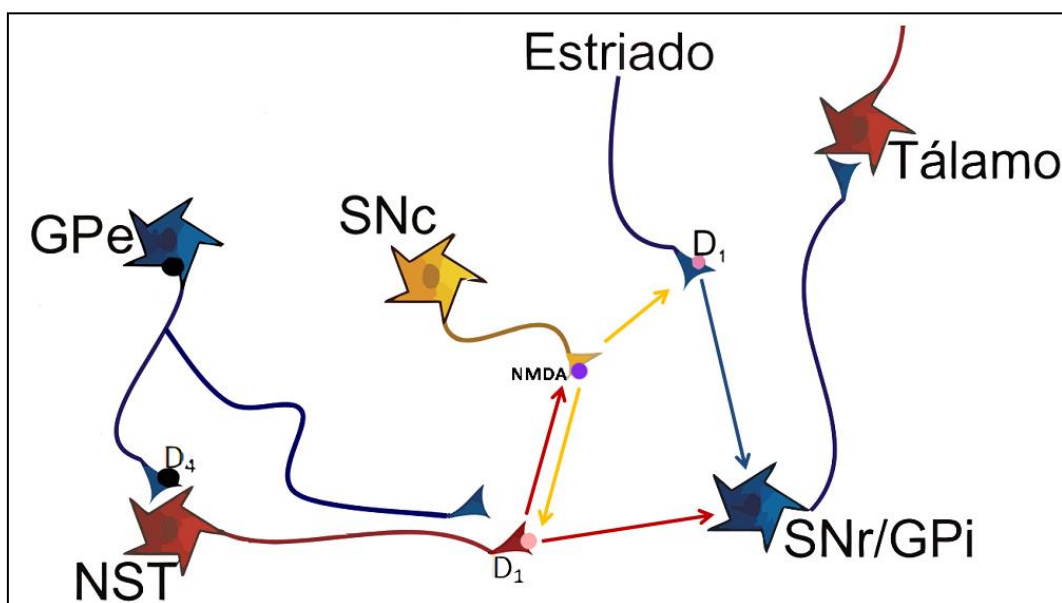


Figura 19. Representación gráfica de la interacción de los neurotransmisores glutamato, dopamina y GABA en la sustancia nigra pars reticulata. Las neuronas GABAérgicas se representan de color azul, las glutamatérgicas se presentan en rojo y las dopaminérgicas en color amarillo. Las flechas salientes de las aferentes representan la liberación del neurotransmisor correspondiente. El glutamato liberado de las aferentes subtálamo-nigrales activa receptores NMDA en las dendritas de las neuronas de la sustancia nigra compacta, propiciando el aumento de la liberación de dopamina, la cual, mediante la activación de receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales y subtálamo-nigrales, ocasiona el aumento en la liberación de GABA y glutamato, respectivamente. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; NST, núcleo subtalámico; SNc, sustancia nigra compacta; SNr, sustancia nigra reticulata.

ANTECEDENTES

2.2 Modulación de la entrada glutamatérgica subtálamo-nigral por receptores D₃.

Además de los receptores de tipo D₁, las neuronas del núcleo subtalámico expresan receptores de la familia D₂, y en particular, se ha encontrado la expresión del receptor D₃ (Diaz *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 1999).

La ubicación de los receptores del tipo D₃ mediante autorradiografía del *binding* con [³H]7-OH-DPAT, reveló que dicho receptor se encuentra -entre otros núcleos-, en el núcleo subtalámico y en la sustancia nigra reticulata, es decir, tanto en el soma como en las terminales de las neuronas glutamatérgicas subtálamo-nigrales (Fig. 20) (Flores *et al.*, 1999).

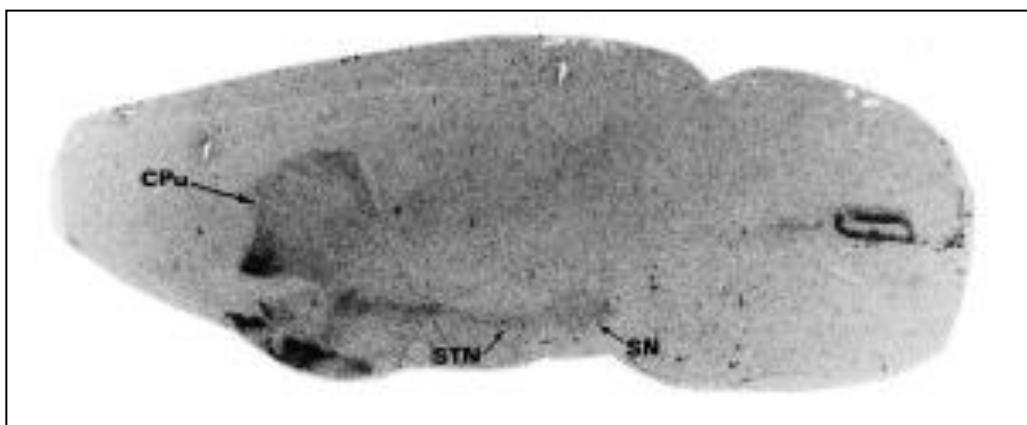


Figura 20. Fotografía del autorradiograma ilustrando la distribución de los sitios de unión a receptores dopaminérgicos de tipo D₃ en sección sagital de cerebro de rata (15 μ M). La sección se tomó al nivel del núcleo subtalámico y se utilizó [³H]7-OH-DPAT como marcador. (Tomado de Flores *et al.*, 1999).

Al utilizar el agonista no selectivo D₂/D₃ quimpirol y registrar las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs, por sus siglas en inglés) en la SNr (Fig. 21), se observa que al ser activado, dicho receptor disminuye las EPSCs, mientras que el protocolo de pulsos pareados da cuenta de la localización presináptica de este (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006), es decir, la dopamina modula presinápticamente las proyecciones subtalámicas dirigidas a la sustancia nigra reticulata.

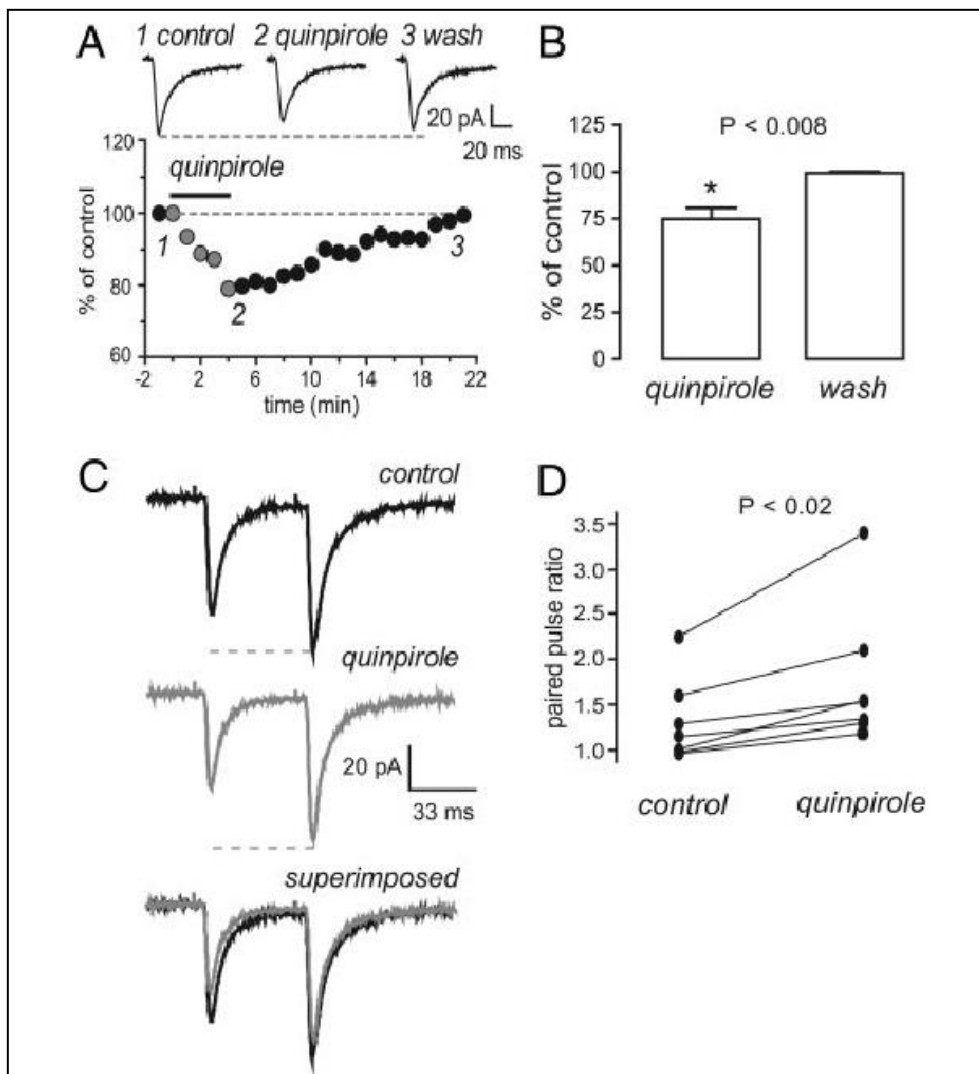


Figura 21. La activación de receptores dopaminérgicos del tipo D₂ disminuye las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) subtálamo-nigrales. A: Curso temporal de 1 μM de quinpirol, agonista D₂/D₃, sobre la amplitud de las EPSCs evocadas. La barra negra indica el tiempo de aplicación del agonista, y los trazos superiores corresponden a registros representativos indicados con números en el curso temporal. B: Histograma resumen del experimento: el agonista D₂ produce disminución significativa de las EPSCs. C: Respuesta a la estimulación con pulsos pareados en condiciones control y en presencia de 1 μM de quinpirol (trazo gris). Los trazos inferiores muestran la superposición de los trazos control y con tratamiento. D: El cambio en la razón de pulsos pareados (2^a. EPSC/1^a. EPSC) en una muestra de neuronas estuvo siempre en la misma dirección: aumento de la facilitación sináptica. (Tomado de Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006).

ANTECEDENTES

2.3 Modulación de la entrada GABAérgica pálido-nigral por receptores D₄.

Diversas observaciones sugieren que la liberación palidal de GABA hacia la SNr está modulada por receptores dopaminérgicos del tipo D₄. Estudios tanto morfológicos como neuroquímicos muestran que dicho receptor se encuentra expresado tanto en el soma como en las terminales palidales (Mrzljak *et al.*, 1996; Ariano *et al.*, 1997; Flores *et al.*, 1999; Floran *et al.*, 2004b) (Fig. 22).

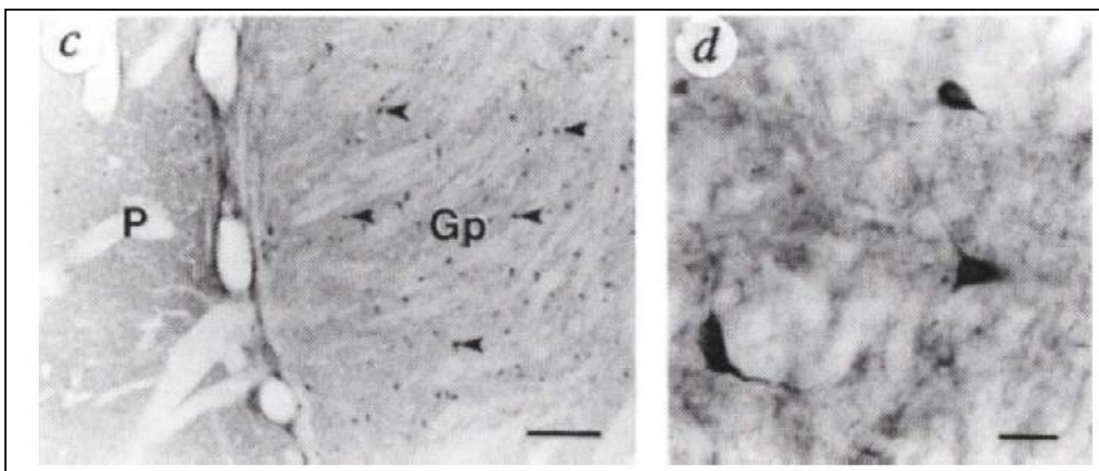


Figura 22. Inmunorreactividad para el receptor D₄ en los ganglios basales. c: Se observa micrografía del putamen (P) y del globo pálido externo (GP) – la inmunorreactividad en el putamen es despreciable; las cabezas de flecha indican inmunorreactividad para el receptor D₄ en el GP, mostrada a más alta resolución en d. Las barras de escala representan 200 y 30 μ M, respectivamente. (Tomado de Mrzljak *et al.*, 1996).

En experimentos de liberación de [³H]GABA, pudo evidenciarse la naturaleza del receptor D₄ y la modulación que ejerce sobre la liberación de dicho neurotransmisor desde el globo pálido hacia la sustancia nigra reticulata. Tanto la dopamina como un agonista altamente selectivo para los receptores de tipo D₄ (PD 168,077) produjeron una disminución en la liberación de GABA en las terminales pálido-nigrales; dicho aumento se ve prevenido cuando se antagoniza el receptor con L-745,870 (Fig. 23) (Acosta-García *et al.*, 2009).

ANTECEDENTES

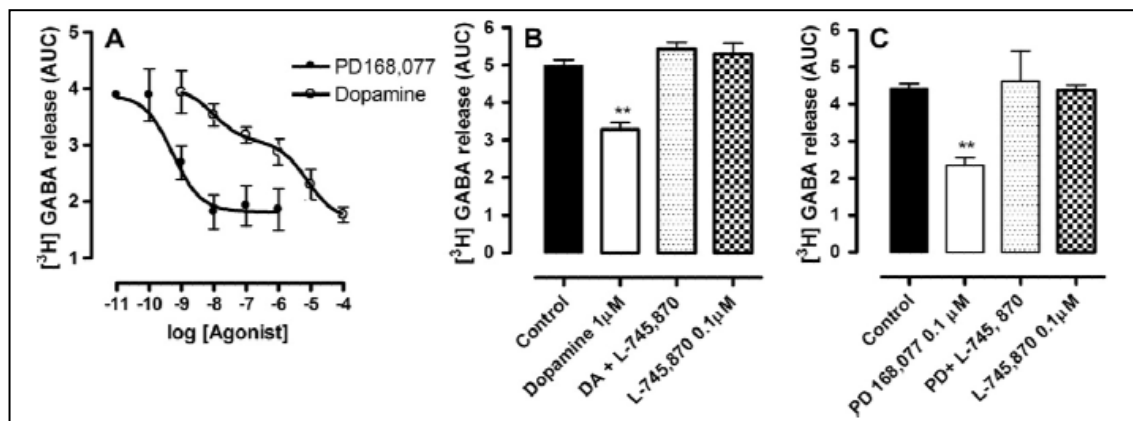


Figura 23. La inhibición de la liberación de $[^3\text{H}]$ GABA estimulada por dopamina en la sustancia nigra reticulata está mediada por receptores D_4 . A. Curva dosis-dependiente del efecto de la dopamina y el agonista selectivo D_4 , PD 168,077 sobre la liberación de $[^3\text{H}]$ GABA en rebanadas de sustancia nigra pars reticulata. Para los datos obtenidos con PD 168,077, $IC_{50}=5.3$ nM, CI desde 1 a 37 nM; para los datos obtenidos con dopamina, $IC_{50}=7.65$ nM, CI desde 0.20 a 28.9 μM . Los valores son promedio \pm S.E.M. $n=6$ experimentos, 5 réplicas por determinación. B. La modulación de la liberación de $[^3\text{H}]$ GABA producida por la dopamina, es antagonizada por el antagonista selectivo D_4 , L-745,870. C. El efecto del PD 168,077 es también antagonizado por el L-745,870. Se utilizó SCH 23390 (0.1 μM) en todos los experimentos para bloquear a los receptores D_1 . Los valores son promedio \pm S.E.M. $n=5$ experimentos, 4 réplicas en cada uno, en B y C. $**p \leq 0.01$ con respecto al control. (Tomada de (Acosta-García *et al.*, 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La única aproximación hasta el momento que explica la interacción glutamato/dopamina/GABA en la Sustancia Nigra Reticulata es la propuesta por Rosales y cols. (1997), y aunque toma en cuenta la participación de receptores dopaminérgicos D₁, no contempla la participación de los receptores D₃ y D₄ localizados presinápticamente, por lo que es necesaria una reevaluación del modelo utilizando las herramientas farmacológicas actuales, para elucidar su participación en el control de la actividad de las neuronas de proyección nigro-talámicas.

4. JUSTIFICACIÓN

Las neuronas GABAérgicas de la sustancia nigra reticulata constituyen la principal vía de salida de información de los ganglios basales, por lo que representan un punto crítico y de suma importancia, en cuanto al control motor se refiere.

Como se ha mencionado, la SNr recibe información tanto excitatoria, como inhibitoria; además de la dopamina que bien puede ser denominada como mediadora de las dos.

Debido a la convergencia de neurotransmisores -glutamato, dopamina, GABA- y a la relevancia de este núcleo en padecimientos como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington o la epilepsia, es de crucial importancia el estudio a detalle de los factores involucrados en su funcionamiento, entre ellos, y como punto focal de este trabajo, la relación de los neurotransmisores mencionados y la participación de los receptores dopaminérgicos D₃ y D₄ sobre esta.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata, que determina la actividad de las neuronas nigrales, también involucra los receptores D₃ y D₄ presinápticos de las aferentes subtalámicas y palidales.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evidenciar el papel de los receptores dopaminérgicos D₃ y D₄ en la interacción glutamato/dopamina GABA en la sustancia nigra pars reticulata de rata no anestesiada y en libre movimiento.

6.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar la participación de los receptores dopaminérgicos D₃ presentes en las aferentes subtálamo-nigrales sobre la liberación de glutamato a la sustancia nigra pars reticulata.
2. Esclarecer la participación de los receptores dopaminérgicos D₃ en la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra reticulata, y el impacto de su bloqueo farmacológico sobre dicha interacción.
3. Estudiar la participación de los receptores dopaminérgicos D₄ presentes en las aferentes pálido-nigrales sobre la liberación de GABA a la sustancia nigra pars reticulata.
4. Caracterizar la participación de los receptores dopaminérgicos D₄ en la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra reticulata, y el impacto de su bloqueo farmacológico sobre dicha interacción.
5. Proponer un nuevo modelo de interacción de neurotransmisores en la sustancia nigra pars reticulata, que integre los hallazgos obtenidos acerca de la participación de los receptores D₃ y D₄.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 220 a 240 g. Se mantuvieron con ciclos de luz-oscuridad (12x12 h, iniciando el periodo de luz a las 6 a.m), y alimentación *ad libitum*. Los experimentos de microdiálisis se iniciaron entre las 7:00 y 9:00 horas.

7.2 Cirugía Estereotáxica

Para los experimentos de microdiálisis, los animales fueron implantados con cánulas guía de plástico

Las ratas fueron anestesiadas con una solución de ketamina/xilacina (75 mg/kg de peso, de ketamina; 5.6 mg/kg de peso, de xilacina, vía i.p.) y colocadas en un aparato estereotáxico (David Kopf). Las coordenadas de la SNr se calcularon de acuerdo al atlas de coordenadas estereotáxicas (Fig. 24) (Paxinos and Watson, 1998).

Se utilizó una inclinación de 47° con respecto de la horizontal y las siguientes coordenadas a partir de bregma:

Anteroposterior: -8.7 mm

Lateral: -1.9 mm

Dorsoventral: -7.0 mm (a partir de la duramadre)

La cánula se introdujo a través de un trépano de 2-3 mm de diámetro realizado en el hueso temporal derecho del animal. Se colocaron además dos tornillos (2 mm de diámetro) en ambos temporales, para posteriormente fijarlos con acrílico dental.

Tras la cirugía, se administró a la rata con un antibiótico de amplio espectro (Enrofloxacin, 5 mg/kg de peso, vía s.c.) y se le colocó un collarín plástico alrededor del cuello.

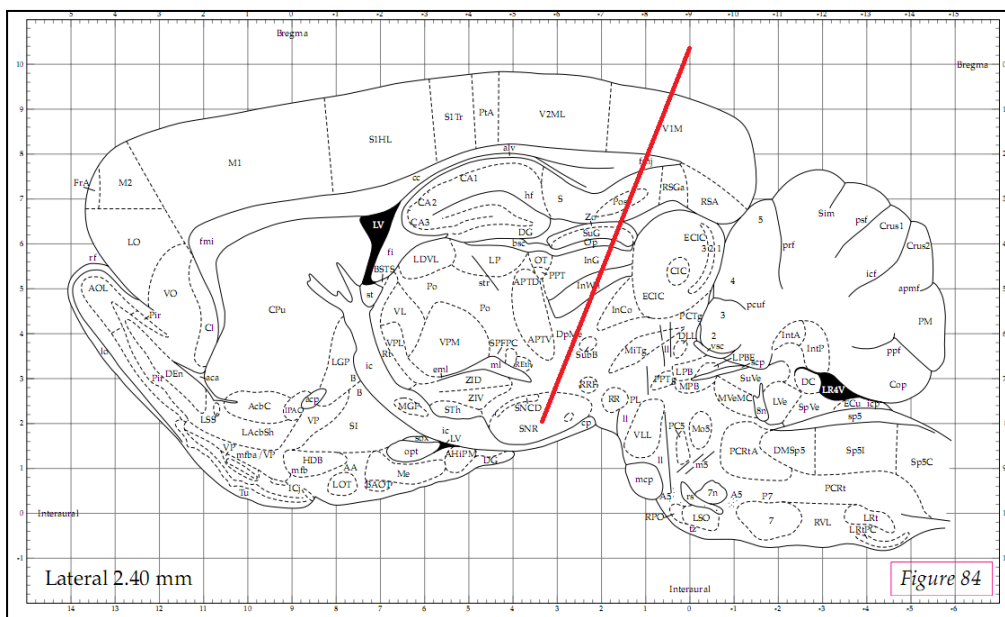


Figura 24. Posición de ingreso de la cánula de microdiálisis en la SNr. (Modificado de Paxinos and Watson, 1998).

7.3 Experimentos de microdiálisis

Los experimentos de microdiálisis se realizaron después de un periodo de recuperación de 4 a 6 días tras la cirugía.

Se utilizaron cánulas de microdiálisis (CMA/11. CMA Microdialysis AB) de 14 mm de longitud, diámetro externo de 0.38 mm y volumen interno de 1 μ L; con membrana de cuprofano, de 1 mm de longitud, 0.24 mm de diámetro y poro de exclusión molecular de 6 KDa (Fig. 25).

Después de introducir la cánula de microdiálisis a través de la cánula guía, el animal se ubicó en el sistema CMA/120 (Carnegie Medicin) mediante el collarín plástico previamente colocado. Dicho sistema permite el libre movimiento de la rata durante el experimento y evita que la tubería flexible de plástico con que se conecta la bomba de perfusión a la cánula, se enrede.

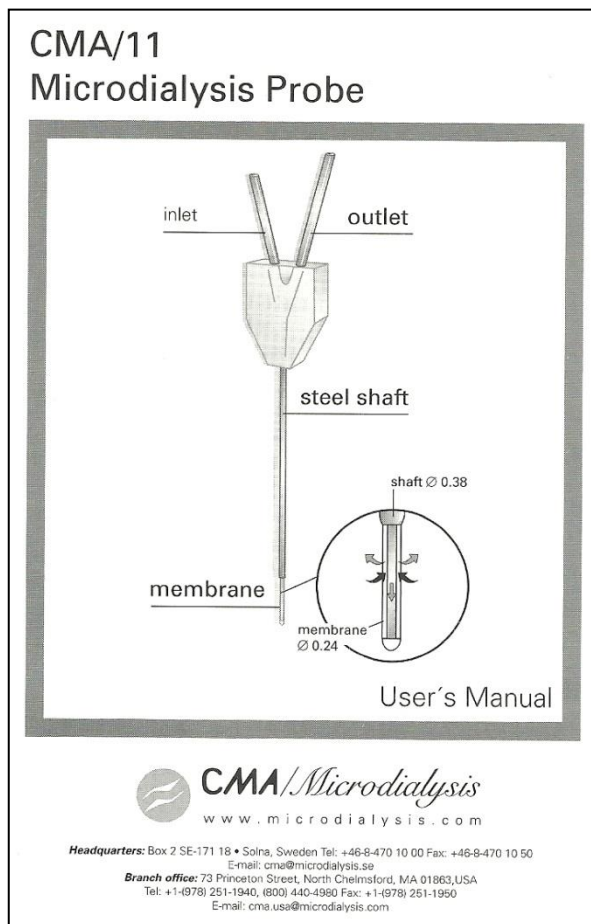


Figura 25. Esquema de la cánula de microdiálisis utilizada en los procedimientos experimentales (Tomado de CMA Microdialysis probe User's Manual).

Previo a las maniobras farmacológicas, se determinaron las concentraciones basales de dopamina, GABA y glutamato. Tras la colocación de la cánula, se perfundió solución Ringer (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Dextrosa 3mM, Na_2HPO_4 2 mM, CaCl 1.2 mM, MgSO_4 1mM, NaH_2PO_4 0.5 mM) mediante una bomba de perfusión continua (CMA/100. Carnegie Medicin), a un flujo de 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta alcanzar la estabilización (mínimo 2 horas).

En todos los casos se tomaron colectas de 50 μL ($F=2.0 \mu\text{L}/\text{min}$, $t=25 \text{ min}$), de los cuales se utilizaron 25 μL para la determinación inmediata de dopamina utilizando HPLC con detección electroquímica, mientras que los restantes 25 μL se sometieron a derivatización precolumna para determinar GABA y glutamato utilizando HPLC con detección fluorométrica.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.3.1 Estrategias farmacológicas

En la totalidad de los experimentos, tras el periodo de estabilización se realizaron tres colectas basales para posteriormente perfundir con los fármacos como se indica a continuación, y terminar de nueva cuenta con tres colectas cuando los neurotransmisores hubieron regresado a sus concentraciones basales:

Tabla 1. Esquema de perfusión de fármacos

		Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3		Protocolo 4			Protocolo 5		Protocolo 6		
Fármacos		NMDA	GR	SCH	GR	SCH	A.K.	GR	L	NMDA	SCH	L	NMDA
Tiempo de Colecta	-75												
	-50												
	-25												
	0												
	25												
	50												
	75												
	100												
	125												
	150												
	175												
	200												

Clave de fármacos:

NMDA: N-metil-D-aspartato (Sigma Aldrich). Perfundido a concentración de 3 mM.

GR: GR 103691 (Sigma Aldrich). Perfundido a concentración de 100 nM.

SCH: SCH 23390 (Sigma Aldrich). Perfundido a concentración de 1 μ M.

A.K.: Ácido Kinurénico (Sigma Aldrich). Perfundido a concentración de 3 mM.

L: L-745,870 (Sigma Aldrich). Perfundido a concentración de 1 μ M.

7.4 Cuantificación de dopamina por HPLC

Alícuotas de 25 μL del dializado se inyectaron directamente en un cromatógrafo Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector (Waters Corporation), utilizando un inyector manual Rheodyne con un asa de 20 μL . Para la detección fluorométrica, se fijó la longitud de onda de excitación en $\lambda_{\text{ex}}=279$ nm, mientras que la longitud de emisión se fijó $\lambda_{\text{em}}=320$ nm; la ganancia de intensidad la señal se ajustó como Gain=1000.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna para HPLC Atlantis, con gel de sílice incorporado con cadenas alquil C18 como empaque (tamaño de partícula = 3.0 μm), y dimensiones de 2.1 x 150 mm (Waters Corporation).

La composición de la fase móvil fue la siguiente: ácido monocloroacético (9.48 mg/L), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (189 mg/L, ácido), ácido 1-octanesulfónico (166 mg/L). Se utilizó una concentración final de 4.5% de acetonitrilo y se ajustó el pH a 3.2 con NaOH (Rosales *et al.*, 1997). Tras ser preparada, la fase móvil se filtró con una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro 0.22 μm (Millipore Corporation) y se desgasificó durante 3 minutos con agitación y vacío.

Se utilizó una bomba para HPLC BAS PM-80 (BAS Inc.) y se fijó un flujo de trabajo de 0.37 mL/min, alcanzando una presión de 3450 \pm 50 psi.

7.5 Cuantificación de GABA y glutamato por HPLC

Alícuotas de 25 μL del dializado se sometieron a derivatización precolumna (25 μL de dializado + 10 μL de solución derivatizadora) durante 2 minutos para posteriormente inyectarse en un cromatógrafo Antec Leyden Intro LC-EC, utilizando un inyector manual Rheodyne con un asa de 20 μL .

Para la solución derivatizadora, se utilizó o-ftalaldehído (OPA), metanol (MeOH), 2- β -mercaptoetanol (2BME) y solución de tetraborato de sodio 0.1 M (borax) en las siguientes proporciones: 37 μL MeOH/mg OPA, 0.19 μL 2BME /mg OPA y 334 μL borax/mg OPA, en dicho orden (Quiroz-Gonzalez *et al.*, 2013). Dicha solución se preparó fresca para cada experimento de microdiálisis.

Para la detección electroquímica, se ajustó el voltaje del electrodo de trabajo, dentro de la celda de detección, a un potencial de +0.550 mV. Se programó un filtro digital de 1 s para reducir el ruido de la señal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna para HPLC Ascentis Express, con gel de sílice incorporado con cadenas alquil C18 como empaque (tamaño de partícula = 2.7 μm), y dimensiones de 4.6 x 100 mm (SUPELCO Analytical. Sygma-Aldrich Co.).

La composición de la fase móvil fue la siguiente: fosfato disódico (35.814 g/L), se utilizó una concentración final de 20% de metanol y 3.5% de acetonitrilo, para posteriormente ajustar el pH a 6.7 con ácido fosfórico (Quiroz-Gonzalez *et al.*, 2013). Tras ser preparada, la fase móvil se filtró con una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro 0.22 μm (Millipore Corporation) y se desgasificó durante 3 minutos con agitación y vacío.

Se utilizó una bomba para HPLC Waters 515 (Waters Corporation) y se fijó un flujo de trabajo de 1.0 mL/min, alcanzando una presión de 3000 \pm 100 psi.

7.6 Histología

Una vez terminado el experimento, los animales fueron anestesiados con solución ketamina/xilacina (75 mg/kg de peso, de ketamina; 5.6 mg/kg de peso, de xilacina, vía i.p.) y sacrificados por dislocación cervical. El cerebro se removió cuidadosamente y se colocó en una solución de paraformaldehído al 4% por 24 h. Una vez fijado, se procedió a la obtención de rebabadas sagitales de 300 μm utilizando un vibratomo (Oxford).

Las rebanadas se observaron al microscopio para verificar la posición de la cánula. Solo los experimentos en los cuales se confirmó la correcta colocación de la cánula en la SNr fueron incluidos en el estudio.

7.7 Análisis estadístico

Los incrementos o decrementos en la liberación de los neurotransmisores se expresaron como porcentaje con respecto al valor basal (dicho valor se obtuvo mediante el promedio de los tres valores basales, previo a la adición de fármacos y su posterior normalización a 100%). La significancia de los cambios mencionados se determinó mediante ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett.

8. RESULTADOS

8.1 Canulación en la sustancia nigra pars reticulata

La correcta colocación de la cánula guía en el núcleo de interés, en este caso la SNr, constituye el paso crítico para obtener resultados favorables durante los experimentos de microdiálisis, ya que si no se realiza una correcta canulación, la observación tanto de dopamina, como GABA y glutamato será nula.

En seguida se presenta una fotografía representativa que muestra el rastro de la cánula guía en una rebanada de cerebro de rata (300 μm), y su colocación final en la SNr (Fig. 26), mostrando estructuras fácilmente distinguibles a partir de la comparación con el esquema del atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de la rata (Paxinos and Watson, 1998) (ver Fig. 24).

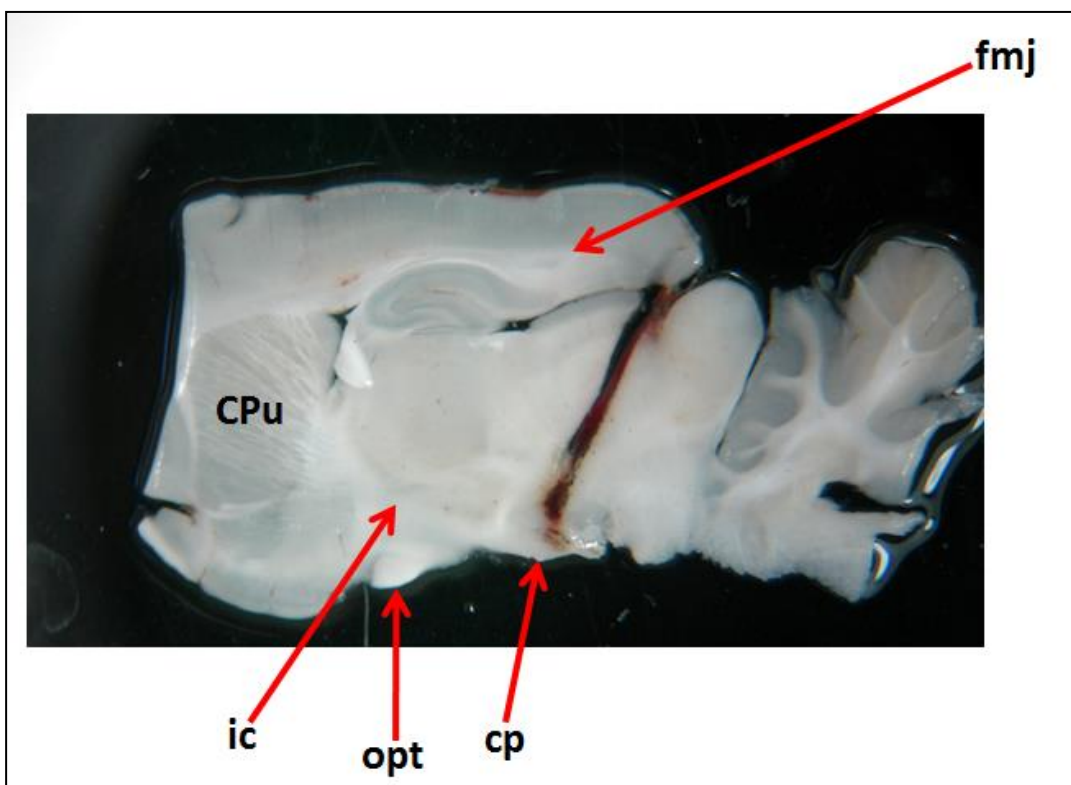


Figura 26. Fotografía representativa de la ubicación correcta de la cánula de microdiálisis en la SNr. Se indican estructuras distinguibles que confirman la correcta ubicación tanto anteroposterior como lateral de la cánula. Cp, pedúnculo cerebral; CPu, estriado; fmj, fórcex menor del cuerpo caloso; ic, cápsula interna; opt, tracto óptico.

RESULTADOS

8.2 Niveles basales de dopamina, GABA y glutamato en la SNr

Los niveles basales en la SNr de los neurotransmisores mencionados, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 2. Concentraciones basales de DA, GABA y GLU en dializados de la SNr en la rata despierta y en libre movimiento

Neurotransmisor	Concentración Basal (nM)
Dopamina	5.4±0.9
GABA	37.90±3.40
Glutamato	333.05±11.21

Las concentraciones basales de los neurotransmisores se determinaron después de 2 horas a partir de la implantación de la cánula de microdiálisis en la SNr. Las concentraciones determinadas en los dializados corresponden aproximadamente al 10-12% de las concentraciones que se encuentran en el espacio extracelular, tomando en cuenta el valor de recuperación relativa de las cánulas de microdiálisis, reportado por el fabricante.

Los niveles de GABA y glutamato se determinaron -previa derivatización- mediante HPLC, con detección electroquímica, mientras que la dopamina se determinó con detección fluorométrica. Los valores corresponden al promedio \pm el error estándar de 18 experimentos independientes.

8.3 Efecto de la perfusión de N-metil-D-aspartato en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato

La perfusión vía la cánula de microdiálisis, de 3 mM del agonista glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) en la SNr de la rata despierta y en libre movimiento, produjo un aumento significativo en los niveles de DA (258±28%); aumentos en los niveles de GLU (265±35%) y GABA (227±31%) acompañaron al aumento de esta. Los niveles máximos, en todos los casos, se observaron tras 25 minutos tomando en cuenta el inicio de la perfusión del fármaco, produciéndose la progresiva disminución de estos hasta alcanzar los niveles basales una vez se hubo interrumpido la administración de NMDA (Fig. 27).

RESULTADOS

8.4 Efecto de la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato

La perfusión de 100 nM del antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos de tipo D₃, en la SNr de la rata despierta y en libre movimiento, produjo un aumento significativo en los niveles de glutamato (233±25%), sugiriendo la activación tónica de dicho receptor en las aferentes subtálamo-nigrales; además de aumentos de dopamina y GABA (202±7% y 168±9%, respectivamente). Los picos de concentración se observaron a los 25 minutos del inicio de la perfusión del fármaco, disminuyendo estos progresivamente hasta los niveles basales tras la interrupción de la perfusión del antagonista D₃ (Fig. 28).

8.5 Efecto del antagonismo de los receptores D₁ sobre los aumentos de dopamina, glutamato y GABA producidos por la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata

Los aumentos en las concentraciones extracelulares de dopamina, GABA y glutamato producidos por la perfusión de NMDA, son atribuidos a la activación de receptores glutamatérgicos en dendritas de neuronas dopaminérgicas que dan cuenta del aumento de DA, mientras que la subsecuente activación de receptores D₁ -en aferentes estriatales y subtalámicas- produce los aumentos de GABA y GLU, respectivamente (Rosales *et al.*, 1997). Aun cuando el GR 103691 (100 nM) solo actúa sobre receptores de tipo D₃ (Audinot *et al.*, 1998), se observan resultados similares a los obtenidos utilizando NMDA, por lo que mediante la perfusión conjunta del antagonista D₃ y del antagonista selectivo para los receptores dopaminérgicos D₁, SCH 23390, se desenmascaró la participación de estos en los aumentos observados cuando el receptor D₃ es antagonizado.

Inicialmente, la perfusión de 1 µM de SCH 23390, no produce cambios en las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores estudiados.

Posteriormente, la co-perfusión de los antagonistas D₁ y D₃ producen un aumento en los niveles basales de glutamato (151±6%) y dopamina (168±4%), sin embargo, no se observa cambio alguno en las concentraciones de GABA en el curso del tratamiento. El antagonismo de los receptores D₁ abolió por completo la salida de GABA y, al no ser activado dicho receptor en las aferentes subtálamo-nigrales, el aumento de glutamato (y en

RESULTADOS

consecuencia, el de dopamina) es menor en comparación al producido con el antagonismo del receptor D₃ en solitario.

Los aumentos máximos se presentan 25 minutos tras el inicio del tratamiento conjunto y disminuyen gradualmente hasta estabilizarse, cuando los fármacos se retiran (Fig. 29).

8.6 Efecto del antagonismo de los receptores NMDA sobre el aumento en los niveles glutamato y dopamina producidos por la perfusión conjunta de SCH 23390 y GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata

En las aferentes presentes en la SNr, existe expresión de receptores dopaminérgicos de tipo D₃ tanto en las dendritas de la SNc (Tepper *et al.*, 1997), como en los axones subtalámicos (Flores *et al.*, 1999), por lo que fue necesario determinar cuál de estos dos grupos de receptores era antagonizado con el tratamiento farmacológico, y establecer el orden de salida de los neurotransmisores ante el antagonismo del receptor D₃.

Bajo la teoría de que los receptores D₃ presentes en las aferentes subtálamo-nigrales están tónicamente activos y que al antagonizarlos, el glutamato es el primero en aumentar, siendo responsable del aumento de dopamina -activando receptores NMDA- y esta a su vez del aumento de GABA y de glutamato “extra” -activando receptores D₁-, el antagonismo de los receptores NMDA permitiría ratificar o contradecir dicho planteamiento.

Para lo anterior, se inició la perfusión conjunta de SCH 23390 y el antagonista glutamatérgico de los receptores AMPA y NMDA, ácido kinurénico (Stone, 1993; Wu *et al.*, 1994), en concentraciones de 1 μ M y 3 mM, respectivamente, no observándose cambios en los niveles de ninguno de los tres neurotransmisores.

Posteriormente, aunado a la perfusión continuada de los antagonistas mencionados, se inició la perfusión de GR 103691 (100 nM) que produjo un aumento de $167 \pm 5\%$ en los niveles basales de glutamato (pico máximo tras 25 minutos de la perfusión conjunta de los tres antagonistas y progresiva disminución), no observándose cambios en las concentraciones extracelulares de dopamina o GABA (Fig. 30).

Dichos resultados confirman que el antagonismo de los receptores D₃ produce la salida inicial de GLU, sin embargo en este caso, el bloqueo de los receptores NMDA no permite que este provoque la salida de DA, es decir, la salida de glutamato es el punto inicial que

RESULTADOS

produce la salida de dopamina y esta a su vez una salida “adicional” de glutamato y la salida de GABA.

8.7 Efecto de la perfusión de L-745,870 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato

La perfusión de 1 μ M del antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos de tipo D₄, en la SNr de la rata despierta y en libre movimiento, produjo un aumento significativo en los niveles de GABA (210 \pm 25%), sugiriendo la activación tónica de dicho receptor en las aferentes pálido-nigrales; por su parte, no se observaron aumentos de dopamina o glutamato. El pico de concentración se observó a los 25 minutos del inicio de la perfusión del fármaco, disminuyendo este progresivamente. Posteriormente, la perfusión conjunta del antagonista D₄ y de NMDA, propició un aumento adicional y significativo de GABA, sugiriendo que este provenía de las aferentes estriato-nigrales, además de los aumentos ya reportados de dopamina y glutamato producidos por la perfusión de dicho agonista glutamatérgico.

Los tres neurotransmisores presentaron disminución gradual en su concentración hasta retornar a las basales cuando se hubo detenido la perfusión de los fármacos (Fig. 31).

8.8 Efecto del antagonismo de los receptores D₁ sobre el aumento en los niveles de GABA, dopamina y glutamato producidos por la perfusión de L-745,870 y NMDA, respectivamente, en la sustancia nigra pars reticulata de la rata

La co-perfusión de L-745,870 (1 μ M) y SCH 23390 (1 μ M) produjo un aumento en los niveles extracelulares de GABA (246 \pm 13%) (Fig. 30), no afectando el bloqueo de los receptores D₁ el aumento de este aminoácido en comparación con los resultados de la perfusión en solitario del antagonista D₄ (Fig. 29).

Por su parte, el bloqueo de los receptores D₁ abolió por completo el aumento de GLU producido por la perfusión de NMDA, no obstante que el aumento de DA se mantuvo al perfundir el agonista glutamatérgico. Los picos máximos de GABA y DA se produjeron tras 25 minutos del inicio de la perfusión de L-745, 870 y NMDA, respectivamente. Se observa la disminución progresiva de los niveles de neurotransmisores hasta los niveles basales (Fig. 32).

RESULTADOS

De nueva cuenta es claro, que el aumento de GABA producido por el antagonismo de los receptores D₄ en las aferentes pálido-nigrales es independiente de los aumentos de DA y GLU bajo cualquier circunstancia e incluso independiente del propio aumento de GABA proveniente de las aferentes estriato-nigrales.

RESULTADOS

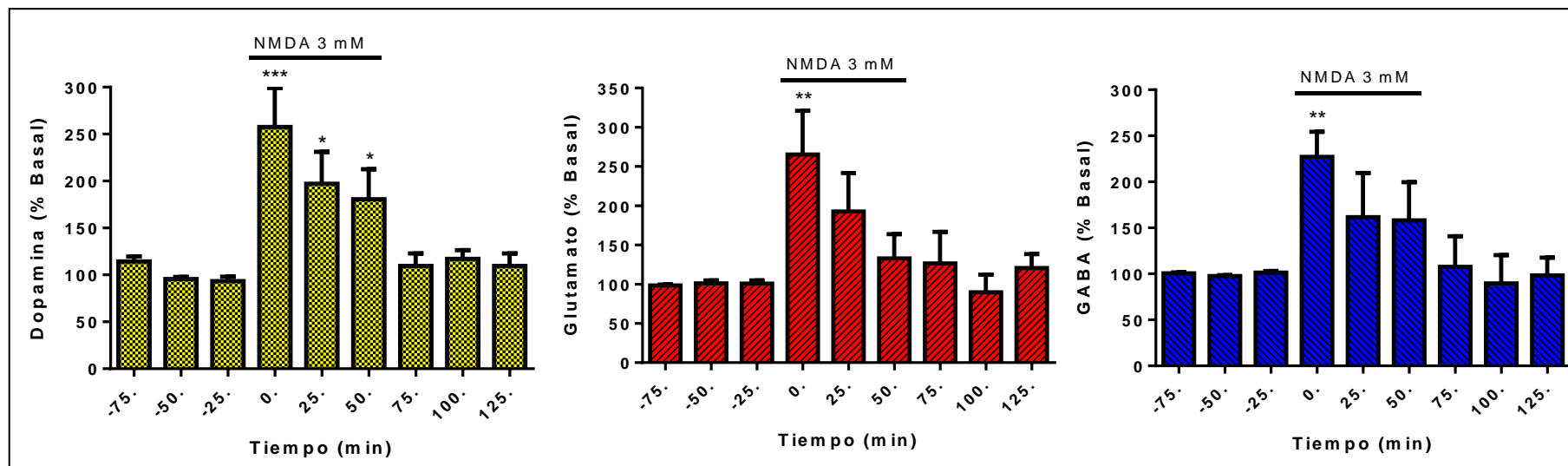


Figura 27. Efecto de la perfusión de N-metil-D-aspartato en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, glutamato y GABA. Los dializados se colectaron en intervalos de 25 minutos. El NMDA (3 mM) estuvo presente (barra horizontal) durante 75 minutos. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de tres diferentes experimentos. Los niveles basales (nM) de los neurotransmisores fueron, dopamina, 6.1 ± 1.3 ; glutamato, 342.69 ± 20.07 ; GABA, 33.10 ± 4.9 . *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ vs control (valor basal inmediato anterior al inicio del tratamiento).

RESULTADOS

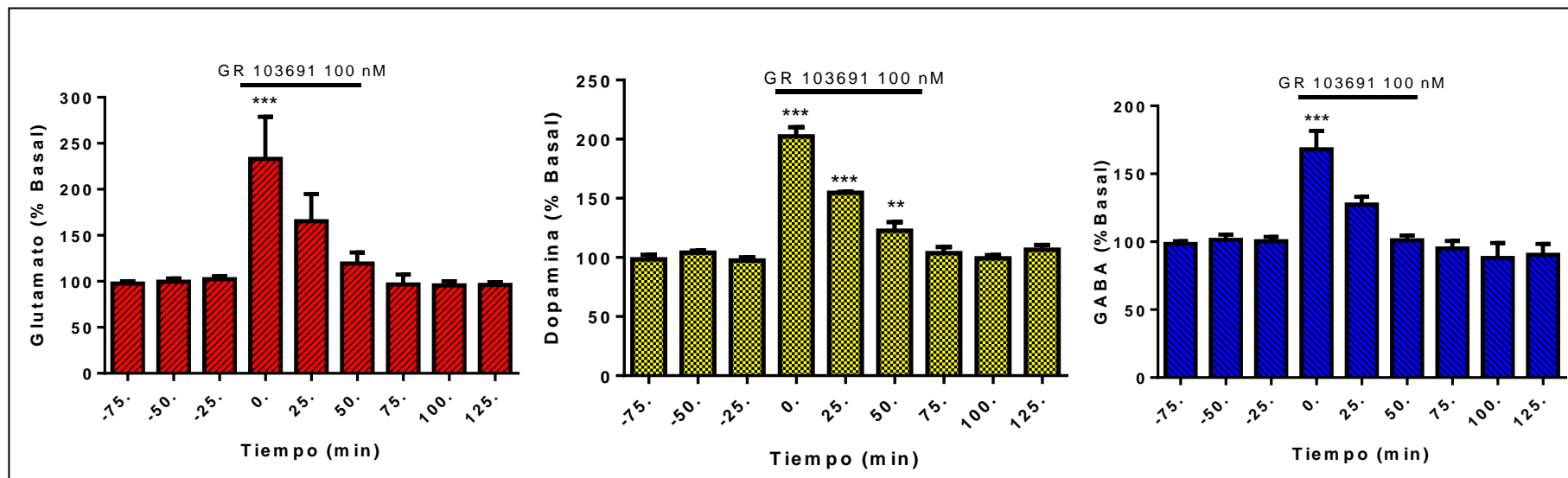


Figura 28. Efecto de la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de glutamato, dopamina y GABA. Los dializados se colectaron en intervalos de 25 minutos. El GR 103691 (100 nM) estuvo presente (barra horizontal) durante 75 minutos. Cada barra representa el promedio±error estándar de tres diferentes experimentos. Los niveles basales (nM) de los neurotransmisores fueron, glutamato, 336.34 ± 13.29 ; dopamina, 5.7 ± 0.4 ; GABA, 30.59 ± 6.0 . *** $p\leq 0.001$, ** $p\leq 0.01$ vs control (valor basal inmediato anterior al inicio del tratamiento).

RESULTADOS

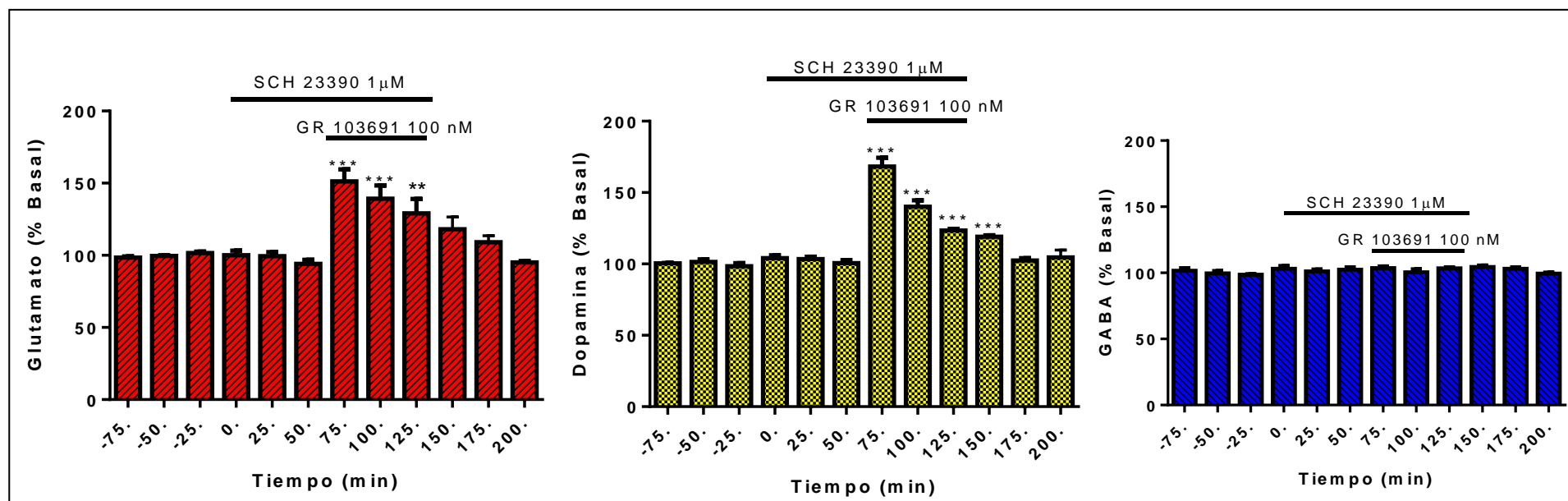


Figura 29. Efecto de la perfusión de SCH 23390 sobre el aumento en las concentraciones basales de glutamato, dopamina y GABA producidos por la perfusión de GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata. Los dializados se colectaron en intervalos de 25 minutos. El SCH 23390 (1 μM) estuvo presente durante 150 minutos (barra horizontal superior), mientras que el GR 103691 (100 nM) estuvo presente durante 75 minutos (barra horizontal inferior). Cada barra representa el promedio ± error estándar de tres diferentes experimentos. Los niveles basales (nM) de los neurotransmisores fueron, glutamato, 331.24 ± 16.52; dopamina, 5.5 ± 0.9; GABA, 33.92 ± 4.7. *** p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.01 vs control (valor basal inmediato anterior al inicio del tratamiento).

RESULTADOS

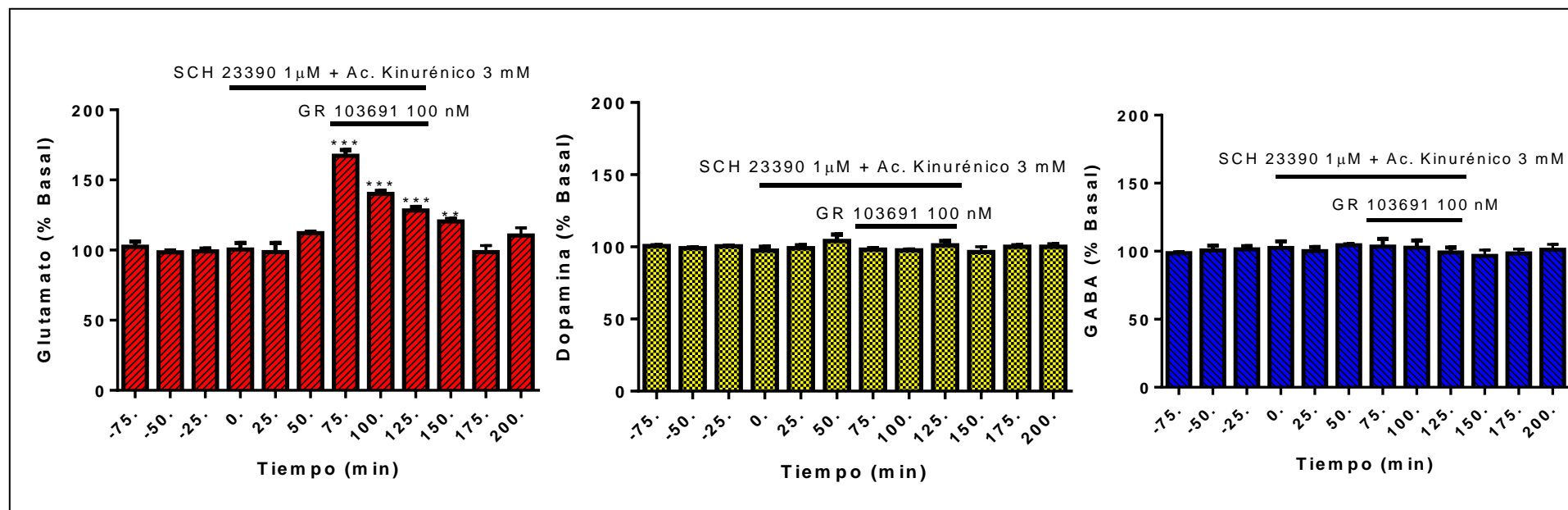


Figura 30. Efecto del antagonismo de los receptores NMDA sobre el aumento en los niveles glutamato y dopamina producidos por la perfusión conjunta de SCH 23390 y GR 103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata. Los dializados se colectaron en intervalos de 25 minutos. El SCH 23390 (1 μ M) y el ácido kinurénico (3 mM) estuvieron presentes durante 150 minutos (barra horizontal superior), mientras que el GR 103691(100 nM) estuvo presente durante 75 minutos (barra horizontal inferior). Cada barra representa el promedio \pm error estándar de tres diferentes experimentos. Los niveles basales (nM) de los neurotransmisores fueron, glutamato 334.21 \pm 15.10; dopamina, 5.1 \pm 0.7; GABA, 39.99 \pm 3.4. *** p \leq 0.001, **p \leq 0.01 vs control (valor basal inmediato anterior al inicio del tratamiento).

RESULTADOS

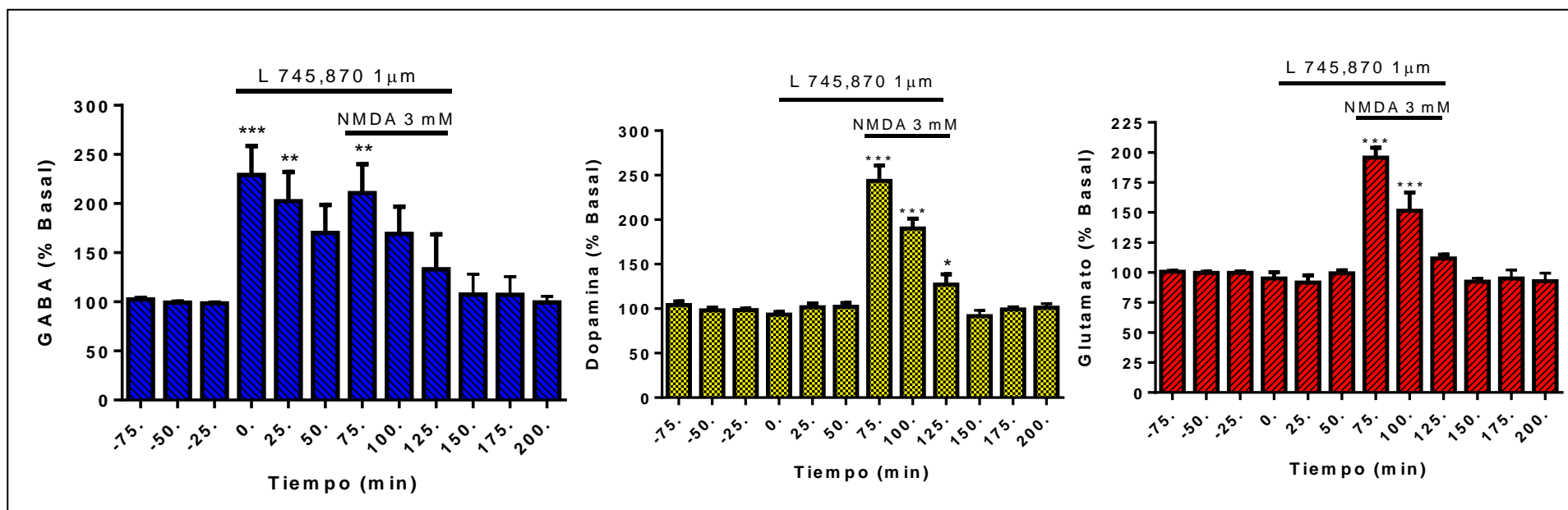


Figura 31. Efecto de la perfusión de L-745,870 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato. Los dializados se colectaron en intervalos de 25 minutos. El L-745,870 (1 μ M) estuvo presente durante 150 minutos (barra horizontal superior), mientras que el NMDA (3 mM) estuvo presente durante 75 minutos (barra horizontal inferior). Cada barra representa el promedio \pm error estándar de tres diferentes experimentos. Los niveles basales (nM) de los neurotransmisores fueron, GABA, 38.50 ± 2.2 ; dopamina, 5.0 ± 1.1 ; glutamato, 338.60 ± 14.77 . *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ vs control (valor basal inmediato anterior al inicio del tratamiento).

RESULTADOS

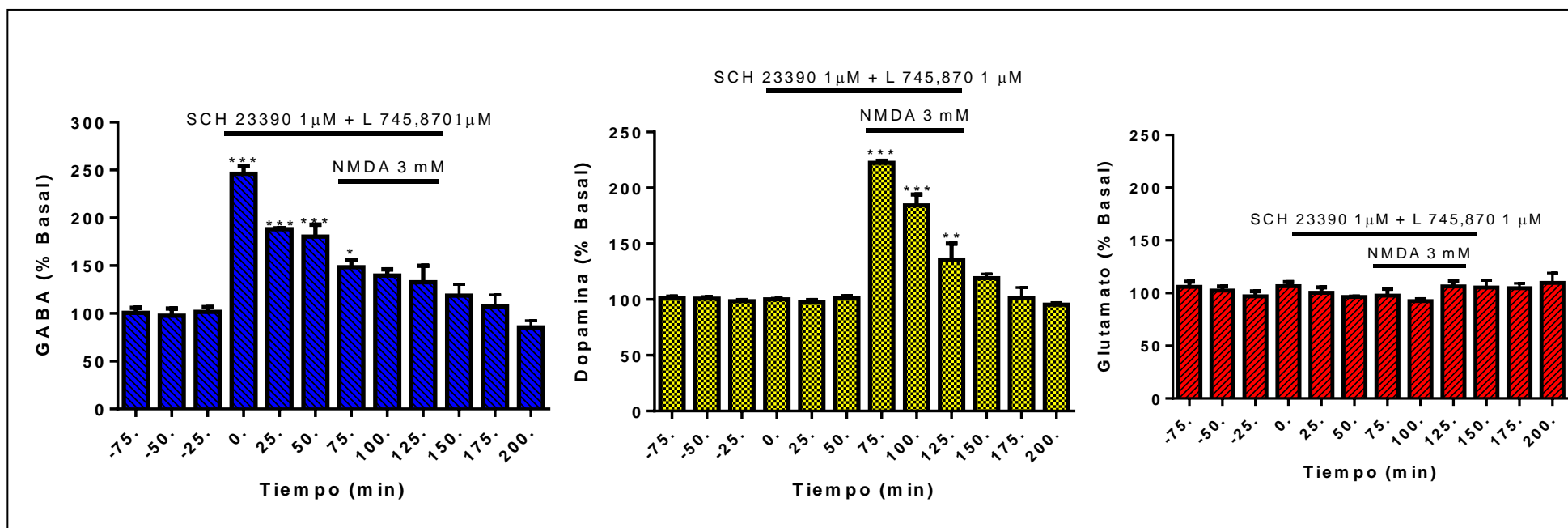


Figura 32. Efecto del bloqueo de los receptores D1 sobre el aumento en los niveles de GABA, dopamina y glutamato producidos por la perfusión de L-745,870 y NMDA, respectivamente, en la sustancia nigra pars reticulata de la rata. Los dializados se colectaron en intervalos de 25 minutos. El SCH 23390 (1 μ M) y el L-745,870 (1 μ M) estuvieron presentes durante 150 minutos (barra horizontal superior), mientras que el NMDA (3 mM) estuvo presente durante 75 minutos (barra horizontal inferior). Cada barra representa el promedio \pm error estándar de tres diferentes experimentos. Los niveles basales (nM) de los neurotransmisores fueron, GABA 45.80 ± 5.2 ; dopamina, 5.3 ± 1.5 ; glutamato, 327.01 ± 10.11 . . *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ vs control (valor basal inmediato anterior al inicio del tratamiento).

9. DISCUSIÓN

9.1 Consideraciones metodológicas

En el presente trabajo se empleó la técnica de microdiálisis para evidenciar los cambios en los neurotransmisores de la sustancia nigra reticulata, en respuesta a fármacos.

Dicha técnica posee diversas ventajas, siendo las principales, la posibilidad de registrar cambios neuroquímicos dinámicos en el espacio extracelular de estructuras cerebrales bien definidas, en animales vivos, no anestesiados y en libre movimiento. (Ungerstedt and Hallstrom, 1987; Anderzhanova and Wotjak, 2013)

Además, debido al reducido tamaño de la cánula de microdiálisis, el daño tisular producido por la implantación de esta es mínimo, lo que permite incluso la implantación de más de una cánula en estructuras cerebrales distantes.

La membrana de diálisis excluye moléculas de alto peso, como enzimas, que podrían degradar los neurotransmisores recobrados en el dializado, haciendo imposible una cuantificación adecuada; aunado a esto, el flujo de perfusión puede ser modificado para eficientar la recuperación (Justice, 1993).

La posibilidad de analizar diversos neurotransmisores -u otros neuroquímicos- a partir de una misma muestra constituye otra primacía de suma importancia, pues minimiza el uso de animales de laboratorio, así como de recursos en insumos en general.

Es de destacarse que diversos autores (Herrera-Marschitz *et al.*, 1996; Timmerman and Westerink, 1997) han demostrado que las concentraciones extracelulares de neurotransmisores de naturaleza aminoacídica (GABA, glutamato, aspartato) poseen componentes tanto de “pools” neuronales clásicos (liberación calcio-dependiente y sensible a TTX), como de “pools” metabólicos (liberación glial no sensible a TTX y no dependiente de calcio), lo que podría significar una desventaja de la técnica de microdiálisis al no ser esta capaz de discriminar entre ambos mecanismos que en su conjunto darían cuenta de la concentración extracelular total del neurotransmisor; no obstante, si se tiene en cuenta que la liberación de los neurotransmisores cuantificados responde a estimulación farmacológica y sensorial, además de que el componente neuronal representaría la gran mayoría de la concentración encontrada en el espacio extracelular, puede sugerirse que el análisis de los

DISCUSIÓN

niveles y cambios de GABA y glutamato presentados en este trabajo, corresponden verdaderamente a lo indicado en los resultados y discusión.

Con respecto a los puntos críticos de la técnica, la correcta colocación de la cánula guía en el núcleo de interés es determinante para el éxito del experimento, ya que, cuando la cánula no se encuentra en la ubicación deseada, es prácticamente imposible observar niveles registrables de los neurotransmisores en estudio; por otra parte, la membrana en el extremo final de la cánula, donde ocurre el intercambio de fármacos y neurotransmisores, es hasta cierto punto delicada, por lo que la implantación de esta representa como tal, otro procedimiento clave que debe llevarse a cabo con el mayor cuidado posible. La mínima fractura en el componente plástico de la membrana produce la filtración del fluido de perfusión, impidiendo con esto tanto la diálisis como la recuperación de dializados.

Al margen de lo anterior, debido a las ventajas mencionadas y a las características del estudio a realizarse, la microdiálisis resultó la técnica ideal a ser empleada en este proyecto. En relación al método cromatográfico utilizado (HPLC), tanto la detección fluorométrica (para la determinación de dopamina), como la electroquímica (para determinar GABA y glutamato) demostraron tener la suficiente sensibilidad para dar cuenta tanto de niveles basales como de cambio en las concentraciones de los neurotransmisores, además de representar una clara ventaja el hecho de que los dializados no requerían de purificación adicional para ser inyectados al cromatógrafo, siendo suficiente el volumen de muestra colectado (25 μ L) para la determinación.

No obstante, a fin de garantizar el correcto funcionamiento del equipo, fue necesario asegurar la pureza de los reactivos utilizados para elaborar fases móviles o estándares (grado HPLC, pureza $\geq 99.9\%$), así como la filtración y desgasificación de dichas soluciones, evitando con esto la entrada de contaminantes y/o aire al sistema.

Algo importante a tomar en cuenta fue la estructura molecular de los fármacos a utilizar, ya que, si esta hubiese tenido alta homología con la estructura de los neurotransmisores de interés, habría sido imposible la diferenciación de ambos en la columna de separación cromatográfica, conduciendo a errores de medición. Como puede inferirse a partir de las nulas desventajas que conlleva la utilización del HPLC, el método de análisis de las muestras resultó ser el idóneo, obteniéndose resultados favorables y reproducibles.

DISCUSIÓN

9.2 Concentraciones basales de dopamina, GABA y glutamato

La introducción de la cánula de microdiálisis -como es de esperarse, al ser un cuerpo extraño-, produce destrucción tisular y como consecuencia se tiene una liberación masiva del contenido celular al espacio extracelular.

Evidentemente, si se registraran los niveles de los neurotransmisores de interés inmediatamente después de la inserción de la cánula de microdiálisis, se observarían concentraciones anormalmente altas (y no representativas de los niveles “normales”), producto del ya mencionado daño celular.

Después de unas horas, mediante procesos de degradación, recaptura y por el propio proceso de diálisis, el exceso de neurotransmisores es removido del espacio extracelular y los niveles se estabilizan.

Con la finalidad de registrar las concentraciones basales reales de los neurotransmisores, no se colectaron muestras para su análisis sino hasta dos horas después de la implantación de la cánula, tiempo suficiente para la estabilización, según diversos autores (Rosales *et al.*, 1997; Windels *et al.*, 2000; Dopico *et al.*, 2006).

Las concentraciones basales de dopamina, GABA y glutamato en la SNr obtenidas en el presente trabajo (Tabla 2) son similares a las reportadas en la bibliografía (Rosales *et al.*, 1997; Matuszewich and Yamamoto, 1999; Windels *et al.*, 2000; Hatzipetros and Yamamoto, 2006).

9.3 Control glutamatérgico sobre la liberación de dopamina en la sustancia nigra pars reticulata de la rata

Desde hace ya varios años, estudios anatómicos han establecido la existencia de aferentes glutamatérgicas -procedentes del núcleo subtalámico, corteza y pedúnculo pontino- en la vecindad de neuronas dopaminérgicas de la SNc (Carter, 1982; Kornhuber *et al.*, 1984; Kita and Kitai, 1987), además, la expresión de receptores para glutamato en dichas neuronas, también ha sido demostrada (Albin *et al.*, 1992; Catania *et al.*, 1994).

La modulación glutamatérgica que ejercen dichas aferentes sobre la liberación de dopamina, ha sido evidenciada mediante el uso del agonista glutamatérgico NMDA, tanto *in vitro* (Araneda and Bustos, 1989) como *in vivo* (Westerink *et al.*, 1992); posteriormente, mediante la estimulación del NST con carbacol para producir la liberación de glutamato, se

DISCUSIÓN

demonstró que fisiológicamente que el aminoácido produce la liberación de dopamina activando receptores NMDA (Fig. 16) (Rosales *et al.*, 1994).

Los resultados del presente trabajo confirman lo expuesto al observarse un aumento de dopamina, que puede ser explicado justamente por la activación de los receptores glutamatérgicos en las dendritas de la SNC; al aumento de DA lo acompañan aumentos de las concentraciones de GABA y del propio glutamato (Fig. 27).

Dichos incrementos pueden ser explicados por la activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D₁ presentes en las aferentes estriato-nigrales (Altar and Hauser, 1987; Yung *et al.*, 1996) y subtálamo-nigrales (Savasta *et al.*, 1986b; Flores *et al.*, 1999), que al ser activados producen aumento en el disparo neuronal y como consecuencia liberación de GABA y glutamato, respectivamente.

Es importante destacar en este punto que, con el advenimiento de nuevas técnicas, ha sido posible determinar que el receptor de tipo D₁ presente en las aferentes subtálamo-nigrales corresponde más bien a un receptor dopaminérgico D₅ (Baufreton *et al.*, 2003), sin embargo al ambos poseer la misma vía de señalización y hasta el momento ser prácticamente indistinguibles entre sí, farmacológicamente hablando, en este trabajo dicho receptor será referido como tipo D₁.

Aun cuando los resultados de este experimentos habían sido publicados con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Rosales *et al.*, 1997), la reproducción del mismo permitió validar tanto la técnica de microdiálisis como el método de cuantificación (HPLC; detección fluorométrica para dopamina, detección electroquímica para aminoácidos), que fueron montados de nueva cuenta en laboratorio tras cierto tiempo de inactividad.

Al respecto, fue necesario modificar ligeramente las condiciones, ya que replicar el experimento a cabalidad, la concentración de agonista (1 mM) resultó insuficiente para observar cambios en los neurotransmisores, por lo que se decidió aumentarla (3 mM).

Tras la maniobra mencionada, fue posible observar los incrementos en las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores, los cuales coinciden con los reportados anteriormente (Fig. 17).

9.4 Papel de los receptores D₃ en la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata de la rata

Aun cuando no se ha estudiado la participación en solitario de los receptores D₃ *in vivo*, existen reportes que dan indicios sobre el papel que ejercen sobre las aferentes subtalámicas en la sustancia nigra reticulata.

Nuestro grupo de trabajo evidenció *-in vitro-* la importancia de los receptores dopaminérgicos inhibitorios en las aferentes subtálamo-nigrales. Mediante experimentos de electrofisiología, registrando las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) en la SNr en respuesta a la activación de receptores D₂/D₃ con su agonista no selectivo, quimpírol, pudo corroborarse una disminución de estas (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006), ratificando el efecto clásico de la activación de dicho tipo de receptores: la disminución del disparo neuronal y por lo tanto de liberación de neurotransmisores.

Además, se sugiere una posible activación tónica de los receptores inhibitorios de las terminales subtalámicas en la SNr, pues tras antagonizarlos con el antagonista no selectivo D₂/D₃, sulpiride, se observa un aumento en las corrientes postsinápticas excitatorias registradas en la sustancia nigra (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006).

Por su parte, la participación directa de los receptores D₃ fue puesta de manifiesto al realizar registros electrofisiológicos en la SNr durante la activación de estos con su agonista selectivo, 7-OH-DPAT, observándose la disminución de las EPSCs (Shen and Johnson, 2012).

La presencia de receptores tipo D₃ en las aferentes subtálamo-nigrales (Flores *et al.*, 1999) hace necesario el estudio de su participación en la estrecha relación que mantienen el glutamato, la dopamina y el GABA en la SNr, por lo que, para tal efecto, se realizó la perfusión de un antagonista altamente selectivo de dicho receptor, el GR 103691 (K_i=0.40 nM) (Audinot *et al.*, 1998).

Para garantizar que solo los receptores D₃ fueran antagonizados, se escogió cuidadosamente la concentración a perfundir, siendo suficiente 100 nM (tomando en cuenta el porcentaje de recuperación de la cánula, se estima que la concentración efectiva del fármaco en el espacio extracelular fue de 10-12 nM) para llegar a una concentración saturante para los receptores D₃, sin incidir sobre ningún otro receptor dopaminérgico (se habría requerido 4 veces más

DISCUSIÓN

compuesto para tener efecto sobre los receptores D₂, 8 veces más para los D₄ y 40 veces más para los D₁).

Como puede observarse (Fig. 28), los resultados obtenidos del solo antagonismo de los receptores D₃ son muy parecidos a los obtenidos con la perfusión de NMDA, es decir, existen aumentos significativos en las concentraciones extracelulares de los tres neurotransmisores en estudio.

Lo anterior podría explicarse considerando la posibilidad de que el receptor de tipo D₃ presente en las aferentes subtálamo-nigrales esté tónicamente activo, es decir, que bajo condiciones fisiológicas, exista la suficiente cantidad de dopamina para mantenerlo activado “permanentemente”, evitando con eso la salida masiva de glutamato hacia la sustancia nigra reticulata, de manera que, al impedir dicha activación mediante un antagonista selectivo, se propicie la salida espontánea de glutamato, incidiendo a su vez sobre los niveles de dopamina y GABA.

Al respecto de esta posible actividad tónica del receptor subtalámico de tipo D₃, es sabido que las neuronas subtalámicas poseen actividad tónica (Beurrier *et al.*, 1999; Bevan and Wilson, 1999) y dicha estimulación -entre otros factores- produce a su vez la activación de la SN (compacta y reticulata) (Iribe *et al.*, 1999), lo que da lugar a un tono dopaminérgico continuo (Mintz *et al.*, 1986) que, aunado a la alta afinidad del receptor D₃ por su ligando endógeno (Missale *et al.*, 1998), mantendría tónicamente activos a estos receptores en las aferentes subtálamo-nigrales, actuando como un “freno” ante la liberación de glutamato, ya que, al ser un receptor dopaminérgico de naturaleza inhibitoria, su activación da lugar a la apertura de canales de K⁺ (Neve *et al.*, 2004) y disminución en la actividad de canales de Ca⁺⁺ (Qin *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1998) que, junto con otros mecanismos, disminuyen el disparo neuronal y a su vez la liberación de neurotransmisores; de manera que, al ser antagonizados, la actividad tónica de las neuronas subtalámicas producirá la salida de glutamato sin que exista la restricción que representa la activación del receptor D₃, dando cuenta del aumento de los niveles extracelulares de glutamato al perfundir el fármaco GR 103691.

Los aumentos de dopamina y GABA, pueden explicarse regresando una vez más al modelo de interacción de los tres neurotransmisores a nivel de la SNr (Fig. 19), es decir, el aumento de glutamato activa receptores NMDA en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de

DISCUSIÓN

la SNc, propiciando el aumento en la liberación de dopamina, que a su vez activará receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales y subtálamo-nigrales, aumentando con ello la liberación de GABA y glutamato, respectivamente.

La participación de los receptores D₁ en los aumentos de GABA y GLU, según se ha descrito, se comprobó con el experimento que se discute enseguida.

9.5 Participación de los receptores D₁ sobre la interacción glutamato/dopamina/GABA producida por el antagonismo de receptores D₃

Como ya se ha hecho mención en múltiples ocasiones, existe expresión de receptores dopaminérgicos D₁ tanto en las terminales estriatales (Altar and Hauser, 1987; Yung *et al.*, 1996), como en las subtalámicas (Savasta *et al.*, 1986b; Flores *et al.*, 1999) de la SNr.

La participación de dichos receptores en el aumento de las concentraciones extracelulares de GABA y GLU en respuesta a la perfusión de NMDA es evidente, pues, cuando se co-perfundan el agonista glutamatérgico y el antagonista D₁, SCH 23390, se previenen los aumentos de los neurotransmisores aminoacídicos (Fig. 18) (Rosales *et al.*, 1997) observados cuando se perfunde el NMDA en solitario (Fig. 17, Fig. 27).

Debido a la similitud de resultados obtenidos ante la perfusión de NMDA y del antagonista D₃, GR 103691 (Fig. 27, Fig. 28), se decidió antagonizar a los receptores D₁ con la finalidad de esclarecer si se estaba ante el mismo mecanismo responsable del aumento de los aminoácidos.

El antagonista selectivo D₁, posee una alta afinidad por dicho receptor (K_i=0.12 nM) (Neumeyer *et al.*, 2003), por lo que, tomando en cuenta la tasa de recuperación de la cánula, decidió perfundirse en concentración de 1 μM (concentración efectiva en el espacio extracelular de 100 nM, aprox.), de tal manera que alcanzase concentración saturante.

Se observa (Fig. 29) que inicialmente, el antagonismo de los receptores D₁ en la SNr no repercute sobre las concentraciones basales de los neurotransmisores en estudio, sin embargo, aún en presencia de idéntica concentración de antagonista D₃ que en solitario provocó aumentos en los niveles basales de los tres analitos (100 nM), en este caso no hay aumento alguno en los niveles de GABA, mientras que el aumento de GLU y DA se ve disminuido.

DISCUSIÓN

El GR 103691, al antagonizar al receptor D₃ -tónicamente activo- en las aferentes subtálamo-nigrales produce un aumento en la liberación de glutamato, que, como ya se ha explicado, activa receptores NMDA en las dendritas de la sustancia nigra pars compacta, propiciando la liberación de dopamina.

Sin embargo, en este caso, al estar antagonizados los receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales, no es posible que la dopamina los active, lo que explica el nulo aumento sobre niveles basales de GABA; caso similar el del glutamato, el antagonismo del receptor D₁ en las aferentes subtálamo-nigrales impide que mediante su activación se produzca liberación “extra” del neurotransmisor (nótese el aumento de 233% en promedio cuando se perfundió el GR 103691 en solitario, contra solo un 151% en promedio cuando se perfundió el antagonista D₃ en presencia del antagonista D₁).

La liberación de DA, por su parte, al estar condicionada a la cantidad de glutamato presente, también se ve disminuida en comparación con la perfusión de solo GR 103691 (202% en promedio, contra 168% en condiciones de antagonismo de los receptores D₁).

Desde este punto, puede observarse que tanto el glutamato -actuando sobre sus receptores- como la presencia de los receptores D₁, son críticos para la interacción de los neurotransmisores en estudio en la sustancia nigra reticulata, lo cual se confirma enseguida.

9.6 Liberación de glutamato como paso inicial en la interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata de la rata

Los datos presentados hasta el momento, indican de forma clara el papel directo y preponderante que juega el glutamato en la relación de neurotransmisores en la SNr, y como su sola liberación permite que el circuito -formado por las aferentes subtálamo-nigrales, estriato-nigrales y dendritas dopaminérgicas- “arranque”, pues se propicia la salida de dopamina, y a partir de esta, la liberación de GABA y de glutamato “extra”.

No obstante que hasta el momento, el aumento de glutamato, y los consecuentes aumentos de dopamina y GABA producidos por el antagonismo de los receptores D₃ con su antagonista selectivo, el GR 103691 (Fig. 28), han sido atribuidos exclusivamente al bloqueo de los receptores encontrados en las terminales subtalámicas, existen estudios (Sokoloff *et al.*, 1990; Santiago and Westerink, 1991; Tepper *et al.*, 1997) que demuestran

DISCUSIÓN

la expresión de dicha clase de receptores en el soma de las neuronas dopaminérgicas, actuando como autorreceptores y regulando la salida de dopamina.

A partir de lo anterior surge el cuestionamiento, ¿es en verdad la salida de glutamato de las aferentes subtálamo-nigrales en respuesta al bloqueo de los receptores D₃ tónicamente activos, el primer paso que explica los aumentos en las concentraciones de los neurotransmisores?, como se ha explicado, dicho glutamato activaría receptores NMDA dendríticos liberando dopamina, que a su vez activaría receptores D₁ en aferentes estriatales, ocasionando la liberación de GABA y en las aferentes subtalámicas, ocasionando la salida de aun más glutamato; ¿o podría ser el antagonismo de los receptores D₃ en el soma de las neuronas dopaminérgicas el primer paso de dichos aumentos?, en este caso el antagonismo de dichos receptores causaría el aumento en la liberación de DA, activando esta los receptores D₁ mencionados y ocasionando aumentos en la liberación de GABA y GLU.

Para responder esta interrogante, dentro del diseño experimental -que tendría como base el antagonismo de los receptores D₃- se propuso antagonizar a los receptores D₁, sabiendo de antemano que este antagonismo suprimiría la liberación de GABA sea cual fuere el primer paso de activación del circuito; por su parte, el antagonismo de los receptores NMDA revelaría verdaderamente el paso inicial que detona el aumento de los neurotransmisores: si no se observaba aumento de dopamina pero si de glutamato estaría claro que el GR 103691 produce salida de glutamato como paso inicial; por el contrario, si se observaba solo aumento de dopamina, la salida de esta, producida por el bloqueo de los receptores D₃ el soma de las neuronas dopaminérgicas, sería el primer paso en la activación del circuito.

El antagonismo de los receptores NMDA se realizó mediante la perfusión de 3 mM de ácido kinurénico (IC₅₀=70 μM) (Stone, 1993), mientras que el antagonismo de los receptores D₃ y D₁ se lograron con los fármacos y concentraciones ya descritas.

Se puede apreciar (Fig. 30) que, la perfusión concomitante de SCH 23390 y ácido kinurénico, no produce cambios en los niveles basales de ninguno de los tres neurotransmisores, sin embargo, la perfusión del antagonista de los receptores D₃, el GR 103691, solo incide en esta ocasión sobre los niveles de glutamato, quedando intactos los niveles basales de dopamina y GABA.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren, como se había comentado previamente, que verdaderamente el receptor D₃ en las aferentes subtálamo-nigrales se encuentra tónicamente activo, de tal manera que su antagonismo produce el aumento inmediato de glutamato, que funge en este caso como iniciador del “arranque” de la interacción glutamato/dopamina/GABA en la SNr.

Es de destacarse que el bloqueo de los receptores NMDA impidió el aumento de dopamina, lo que confirma que la activación de dichos receptores es crucial para la liberación dendrítica de la catecolamina, por su parte, el GABA de nueva cuenta no muestra aumento alguno debido al bloqueo de los receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales.

La aparente no participación del antagonismo de los receptores D₃ somatodendríticos de la SNc, podría explicarse si estos -a diferencia de los encontrados en las aferentes subtálamo-nigrales- no se encontrasen tónicamente activos, lo cual parece ser el caso, ya que Santiago y Westerink (Santiago and Westerink, 1991) en experimentos de microdiálisis en la SN, debieron perfundir el agonista no selectivo D₂/D₃ quimpirol para observar la disminución en los niveles basales de dopamina en el estriado, producto de la activación de los autorreceptores; si estos se encontraran tónicamente activos, la perfusión del agonista no habría incidido sobre la concentración extracelular de dopamina.

Por otra parte, en el mismo estudio se pone de manifiesto que, la perfusión del antagonista no selectivo D₂/D₃ sulpiride, solo provoca un ligero aumento en la concentración de dopamina (apenas un 20%), lo que sustentaría la idea de que estos receptores requieren en efecto ser activados por mayores cantidades de dopamina y no están tónicamente activos. Al respecto, Santiago y Westerink teorizan que los autorreceptores de dicho núcleo podrían ser menos sensibles a los fármacos e incluso a su agonista endógeno, sin embargo dicha teoría no ha sido confirmada o desmentida.

Por otra parte, Tepper y colaboradores (Tepper *et al.*, 1997) demostraron que los receptores somatodendríticos son tanto de tipo D₂ como D₃ y que la regulación de la liberación dopaminérgica depende aditivamente de la activación de ambos, sin embargo, tanto el ARNm como la propia expresión del receptor D₃ es menor en comparación con el receptor D₂ (Diaz *et al.*, 1995), lo que podría explicar que la utilización de un antagonista tan selectivo para los receptores D₃ como lo es el GR 103691, no tenga efecto sobre la

DISCUSIÓN

liberación de dopamina, es decir, el autorreceptor D₂ podría tener una mayor incidencia sobre la regulación dopaminérgica.

9.7 Papel de los receptores D₄ en la interacción glutamato/dopamina/GABA en la sustancia pars reticulata de la rata

Hasta el momento, solo se ha hecho mención de la incidencia que tienen los receptores D₃ en las aferentes glutamatérgicas subtálamo-nigrales, sobre la interacción glutamato/dopamina/GABA en la SNr, sin embargo, la sustancia nigra reticulata posee también aferencias GABAérgicas provenientes del globo pálido externo (Bar-Gad *et al.*, 2003), que no han sido tomadas en cuenta sobre la relación de neurotransmisores en estudio.

Las neuronas del globo pálido externo tienen la particularidad de ser las únicas dentro de los circuitos de los ganglios basales, que expresan al receptor dopaminérgico D₄, tanto en el soma, como en sus terminales sinápticas (Mrzljak *et al.*, 1996; Ariano *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 1998), es decir, es de crucial importancia explorar el hasta ahora desconocido papel del receptor D₄ de las aferentes pálido-nigrales sobre la interacción de neurotransmisores en la sustancia nigra.

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo (Floran *et al.*, 2004b) demostraron que la activación de este receptor en las aferentes pálido-subtalámicas, disminuye la liberación de GABA hacia el núcleo subtalámico, además, la activación del receptor en las aferentes pálido-nigrales y en aquellas enviadas hacia el núcleo reticular del tálamo, produce disminución de la actividad locomotora, debido a la menor inhibición sobre el STN, pudiendo este estimular a la SNr (Erlj *et al.*, 2012).

Con respecto al efecto funcional de la activación de este receptor en las aferentes pálido-nigrales, puede observarse (Fig. 23) que su sola activación ya sea con dopamina o con su agonista selectivo, PD 168,077, disminuye significativamente la liberación de GABA, efecto que se ve prevenido mediante el uso del antagonista selectivo, L-745, 870 (Acosta-García *et al.*, 2009).

Los reportes mencionados dan cuenta de la importancia del receptor D₄ tanto funcional como conductualmente, sin embargo, no se ha establecido su participación en la relación de neurotransmisores en la sustancia nigra reticulata.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de evidenciar el papel de dicho receptor sobre la liberación palidal de GABA y el impacto de esta en las concentraciones de glutamato y dopamina -de haberlo-, se procedió a su antagonismo, con el antagonista selectivo D₄, L-745,870 (K_i=1.5 nM) (Glase *et al.*, 1997). Se perfundió en concentración de 1 μM (concentración extracelular efectiva aproximadamente de 100-120 nM), asegurando la saturación de los receptores D₄ sin afectar a los receptores dopaminérgicos aledaños (se habría requerido 160 veces esa cantidad para incidir sobre receptores D₂, 300 veces más para tener efecto sobre receptores D₁ y 620 la concentración perfundida para actuar sobre los D₃).

Ya que, técnicamente la perfusión de L-745,870 solo incidiría sobre los niveles de GABA -de tener efecto alguno-, la perfusión posterior de NMDA permitió establecer que el fármaco o las maniobras sobre las terminales palidales, no tuviera efecto sobre los aumentos evocados por el agonista glutamatérgico observados con anterioridad.

Como puede observarse (Fig. 31), la perfusión del antagonista D₄ produce un aumento significativo de los niveles extracelulares de GABA, lo que sugiere fuertemente que dicho receptor en las aferentes palidales se encuentra tónicamente activo, “frenando” la salida del neurotransmisor inhibitorio ante la actividad tónica de las neuronas del globo pálido producida por el constante estímulo que recibe del núcleo subtalámico (Perkins and Stone, 1980).

Con respecto a la posible actividad tónica de los receptores D₄ presentes en las aferentes pálido-nigrales, existe un antecedente que indica que dicho receptor está tónicamente activo en eferentes del hipocampo dorsal enviadas al giro dentado (DG), producto del tono dopaminérgico proporcionado por el área ventral tegmental (VTA). Al antagonizar al receptor presente en las terminales sinápticas mencionadas, se observó la inhibición de las neuronas del giro dentado, lo que indicaría que el antagonismo produjo una salida súbita de GABA, responsable de dicha inhibición (Romo-Parra *et al.*, 2005).

Aún cuando se trata de distintos núcleos, si consideramos el tono dopaminérgico constante en la SNr producto de la actividad de la SNc (Mintz *et al.*, 1986) y la alta afinidad del receptor D₄ por la dopamina (Missale *et al.*, 1998), aunado al antecedente presentado, se puede considerar una posibilidad real la actividad tónica de dicho receptor para explicar el aumento de GABA evocado por la perfusión del antagonista L-745, 870.

DISCUSIÓN

Por otra parte, siguiendo con los resultados obtenidos, (Fig. 31), se observa que el NMDA produce los efectos clásicos ya mostrados, es decir, el aumento de los niveles extracelulares de glutamato y por consecuencia de dopamina, y GABA.

Interesantemente, se observa que después del aumento de GABA evocado por el bloqueo de los receptores D₄, y aunque los niveles del neurotransmisor se encontraban en franco descenso, la perfusión de NMDA provocó un nuevo ascenso de la concentración extracelular de GABA, es decir, el aumento inicial puede atribuirse a la liberación pálido-nigral mientras que la evocada con NMDA -como ya se ha explicado- provendría de las aferentes estriato-nigrales; ambos eventos ocurren en diferentes sitios y no incide uno sobre el otro.

Es destacable además, que la perfusión continuada de L-745,870, no afectó los aumentos en los niveles de glutamato y dopamina provocados tras la perfusión del NMDA, lo cual apoya la hipótesis de que la relación glutamato/dopamina/GABA que ocurre entre las aferentes subtálamo-nigrales, estriato-nigrales y dendritas dopaminérgicas es independiente anatómica y funcionalmente con respecto a la liberación pálido-nigral de GABA.

Para continuar elucidando lo expuesto, se diseñó el siguiente experimento.

9.8 Participación de los receptores D₁ en la liberación palidal de GABA producida por el antagonismo de los receptores D₄

Con la finalidad de demostrar que los aumentos de glutamato, dopamina y GABA evocados por la salida inicial de glutamato (o la perfusión de NMDA, haciendo las veces del aminoácido excitatorio) y el aumento de GABA producido al antagonizar a los receptores D₄ palidales, son eventos independientes, en el diseño experimental, se procedió al antagonismo de los receptores D₁ presentes en aferentes estriato-nigrales, y subtálamo-nigrales, aunado a la perfusión de L-745,870, iniciando posteriormente la perfusión de NMDA.

Es evidente (Fig. 32), que la activación de receptores D₁ no incide de ninguna manera sobre la liberación de GABA evocada por el antagonismo de los receptores D₄ palidales, pues si se compara la magnitud del aumento del neurotransmisor cuando el antagonismo se hizo en solitario, contra el antagonismo en presencia del SCH 23390, se aprecia que no existe diferencia significativa entre ambos ($229 \pm 25\%$ y $246 \pm 13\%$, respectivamente).

DISCUSIÓN

Por otra parte, es de mencionarse que, de nueva cuenta, los niveles de glutamato y dopamina no se ven afectador por antagonismo de los receptores D₄.

Sin embargo, se observa que al perfundir el NMDA, solo se observa un aumento en los niveles extracelulares de dopamina, dando cuenta el bloqueo de los receptores D₁ presentes en las aferentes subtálamo-nigrales de la abolición completa del aumento de glutamato observado previamente.

Por otra parte, también se observa que la perfusión de NMDA no produce un segundo aumento de GABA, explicable enteramente por el antagonismo de los receptores D₁ de las aferentes estriato-nigrales.

Con los resultados presentados, se evidencia por completo la independencia de las aferentes pálido-nigrales y el aumento de GABA evocado por el antagonismo de los receptores D₄ presentes en dichas aferentes, de los aumentos y en general, interacción recíproca de glutamato, dopamina y GABA que se produce a partir de la activación de receptores en las aferentes subtálamo-nigrales, dendritas dopaminérgicas de la SNc y aferentes estriato-nigrales, respectivamente.

9.9 Modelo de interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA en la sustancia nigra pars reticulata

Hasta el momento, el modelo propuesto de interacción de neurotransmisores en la SNr, solo contempla la participación de receptores D₁ (Fig. 19) (Rosales *et al.*, 1997), sin embargo, tomando en cuenta los resultados del presente trabajo, en los cuales se pone de manifiesto el papel de los receptores de tipo D₃ en las aferentes subtálamo-nigrales, así como los tipo D₄ en las aferentes pálido-nigrales, es posible proponer un nuevo modelo. Con la finalidad de plantear un modelo lo más acertado posible, es necesario considerar lo siguiente:

1. Existe evidencia suficiente (Araneda and Bustos, 1989; Westerink *et al.*, 1992; Rosales *et al.*, 1994; Rosales *et al.*, 1997) que sustenta la interacción que existe entre glutamato, dopamina y GABA en la SNr, siendo claro que el solo aumento de glutamato, produce aumentos a su vez de dopamina y GABA.

DISCUSIÓN

El glutamato liberado activaría receptores glutamatérgicos presentes en las dendritas de las neuronas de la SNc (Albin *et al.*, 1992; Catania *et al.*, 1994), produciendo el aumento del disparo neuronal y como consecuencia la liberación de dopamina.

Por su parte, la dopamina liberada activaría a los receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales (Altar and Hauser, 1987; Yung *et al.*, 1996) y subtálamo-nigrales (Savasta *et al.*, 1986b; Flores *et al.*, 1999), dando cuenta de los aumentos de GABA y del propio glutamato.

2. El antagonismo de los receptores D₃ en las terminales subtalámicas produce por sí mismo un aumento en las concentraciones de glutamato (conduciendo a los aumentos de dopamina, GABA y del propio glutamato por el mecanismo ya detallado. Siendo esto verificado al abolirse dichos incrementos mediante el bloqueo de los receptores D₁), lo que sugiere actividad tónica inhibitoria de dicho receptor sobre la liberación de glutamato espontánea producida por el disparo tónico de las neuronas subtalámicas.
3. La liberación de glutamato en las aferentes subtálamo-nigrales (y no la liberación de dopamina) es el paso inicial que da lugar al aumento recíproco de los neurotransmisores en estudio, en la SNr.
4. El antagonismo de los receptores D₄ presentes en las aferentes pálido-nigrales produce por sí mismo un aumento en la concentración extracelular de GABA, sin que este afecte en manera alguna los niveles de glutamato o dopamina, lo que sugiere, tanto la actividad tónica del receptor ejerciendo una inhibición “permanente” sobre la liberación de GABA palidal, así como la independencia funcional y anatómica de ambos eventos: el aumento de GABA dado por el antagonismo del receptor D₄ y los aumentos de dopamina, glutamato y GABA dados por el aumento inicial de glutamato y mediados por la activación de receptores NMDA y D₁, respectivamente.

Mediante marcaje retrógrado y técnicas de microscopía, ha sido posible establecer que tanto las aferentes estriatales (Rinvik and Grofova, 1970; Hattori *et al.*, 1973;

DISCUSIÓN

Tulloch *et al.*, 1978), como las subtalámicas (Kita and Kitai, 1987; Smith *et al.*, 1990) forman sinapsis asimétricas del tipo axodendrítico con las neuronas GABAérgicas de la SNr; por su parte, las terminales pálido-nigrales (Smith and Bolam, 1989; Smith and Bolam, 1991) forman sinapsis simétricas preferentemente del tipo axosomático.

5. La activación constante de las neuronas de la SNc debida a la actividad tónica de las neuronas subtalámicas (y consecuente liberación espontánea de glutamato) (Iribe *et al.*, 1999) producen un tono dopaminérgico (Mintz *et al.*, 1986) suficiente para mantener activados tónicamente a los receptores D₃ en las aferentes subtálamo-nigrales y a los receptores D₄ en las aferentes pálido-nigrales. Además, la inervación dopaminérgica en la SNr es tan densa que existe liberación tanto en las dendritas como en el soma de las neuronas del núcleo de salida (Zhou and Lee, 2011)

Como se observa, existe información que apoya la teoría de que la liberación de GABA palidal y la relación glutamato/dopamina/GABA observada, son independientes entre sí e incluso suceden anatómicamente en sitios distintos, llevándose a cabo la primera entre axones palidales y dendritas nigrales, mientras que la segunda se da entre axones estriatales, subtalámicos y dendritas nigrales.

No se debe perder de vista que la dopamina participa de manera crucial en los resultados descritos, pues mantiene niveles tales capaces de activar tónicamente tanto a receptores D₃ como D₄. Esto se logra mediante la intensa inervación dopaminérgica en la SNr (Fig. 2), donde existe liberación del neurotransmisor tanto a nivel somático como dendrítico (Zhou and Lee, 2011).

Mediante la conjunción de la información expuesta, puede generarse el siguiente modelo de interacción (Fig. 33).

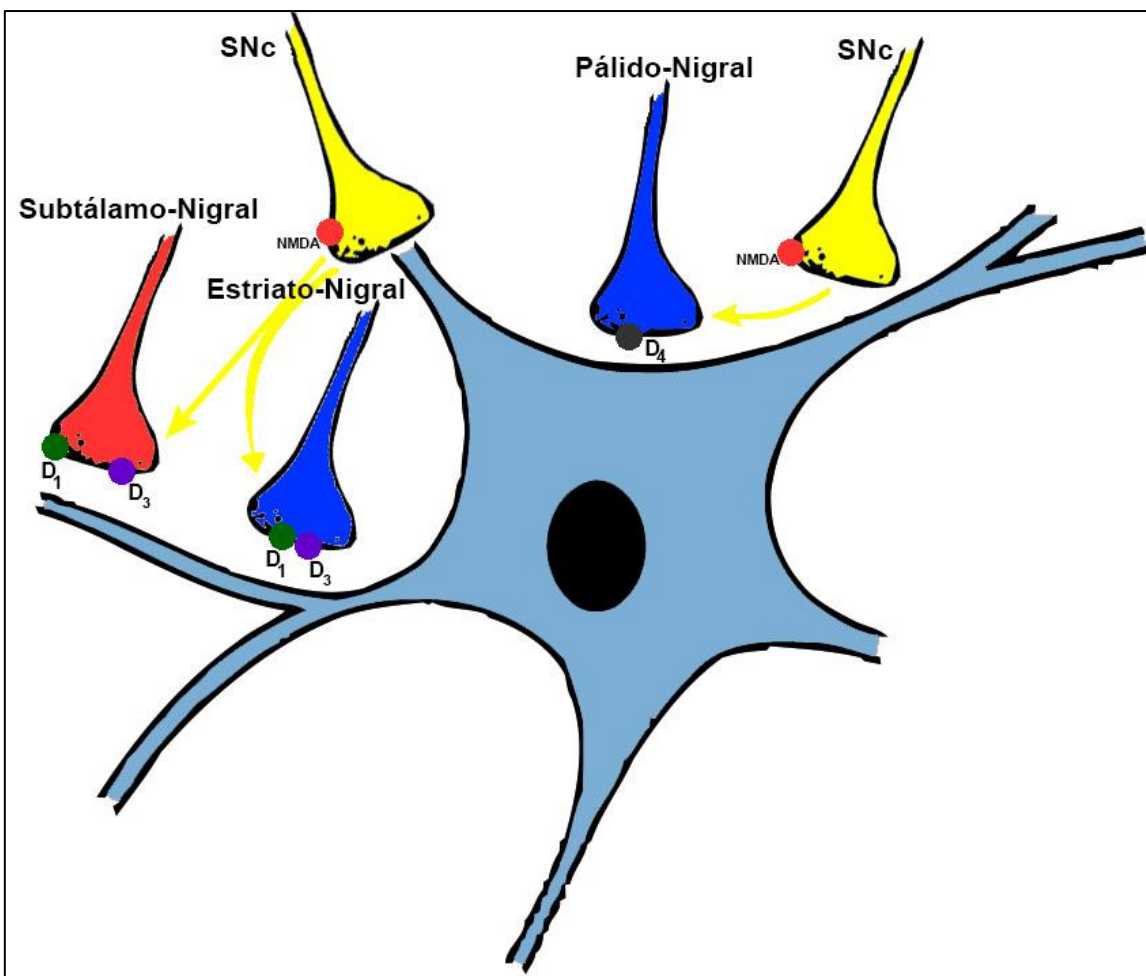


Figura 33. Modelo de interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA en la SNr de la rata. El color azul representa transmisión GABAérgica, el color rojo representa transmisión glutamatérgica, el color amarillo representa transmisión dopaminérgica. Las aferentes pálido-nigrales realizan conexión axosomática con las neuronas de la SNr, las aferentes subtálamo-nigrales y estriato-nigrales realizan conexiones axodendríticas con las neuronas de la SNr. Las dendritas de la neurona de la sustancia nigra pars compacta inervan densamente a la SNr, por lo que realizan conexiones tanto dendrosomáticas como dendrodendríticas, manteniendo un tono dopaminérgico constante.

En las dendritas de las neuronas de la SNr, la liberación de glutamato (desde las aferentes subtálamo-nigrales) activa receptores NMDA presentes en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, produciendo con esto la liberación de dopamina. La dopamina liberada produce la salida de GABA, activando receptores D₁ en las aferentes estriato-nigrales; y de glutamato, activando receptores D₁ en las aferentes subtálamo-nigrales. En estas terminales, el receptor D₃ se encuentra tónicamente activo, modulando a la baja la liberación glutamatérgica.

DISCUSIÓN

Por su parte, en el soma de las neuronas de la SNr, se produce la liberación de GABA desde las aferentes pálido-nigrales, en estas, el receptor D₄ modula a la baja esta liberación al estar tónicamente activo.

La innervación dopaminérgica intensa tanto en soma como en dendritas de la SNr, permite mantener un tono permanente de dicho neurotransmisor, lo que es crucial para la activación tónica de los receptores antes mencionados.

9.10 Consideraciones Adicionales

Como puede observarse (Fig. 33), aunque no se hace mención del receptor D₃ presente en las aferentes estriato-nigrales, dicho receptor se incluye en el esquema, pues existe información concluyente obtenida por nuestro grupo de trabajo (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013; Cruz-Trujillo *et al.*, 2013) acerca de la interacción que existe entre este y el receptor D₁, en particular, ambos receptores forman un dímero, de manera que en condiciones de tono dopaminérgico normal, la activación del receptor D₃ potencia la salida de GABA evocada por la activación del receptor D₁.

Por otra parte, es evidente que se está ante una interacción reverberante, es decir, parecería que se lleva a cabo en un “loop” sin fin: la salida de glutamato produce la salida de dopamina, dicha dopamina produce la salida de GABA y de aún más glutamato, que al producir de nueva cuenta la salida de dopamina, reiniciaría el circuito.

Tanto la limitante en cantidad del “pool” intracelular de neurotransmisores, como la imposibilidad de que el espacio extracelular esté permanente “inundado” de moléculas potencialmente tóxicas como el glutamato, hace imposible el siquiera considerar que el circuito descrito esté en constante actividad bajo condiciones fisiológicas.

Hasta el momento no existe un estudio que se centre en dicha incógnita, sin embargo, especulando acerca del posible mecanismo que sirva como “freno” una vez que el circuito ha sido activado, podemos mencionar a los receptores GABA_B.

Los receptores GABA_B son receptores de siete hélices transmembranales, cuya activación da lugar a la inhibición neuronal mediante la disminución de síntesis de AMPc (y consecuente disminución de la actividad de PKA), además de la activación de canales de K⁺ e inhibición de canales de Ca⁺⁺, lo que da lugar a la hiperpolarización membranal, disminuyendo como consecuencia la liberación de neurotransmisores (Benarroch, 2012).

DISCUSIÓN

Dichos receptores están expresados en las aferentes subtálamo-nigrales (Boyes and Bolam, 2003), y se ha demostrado la atenuación en la liberación de glutamato cuando son activados con su agonista selectivo, baclofén (Cortes *et al.*, 2010); por otra parte, también existe expresión de dichos receptores en las aferentes estriato-nigrales (Bowery *et al.*, 1999), pudiéndose demostrar también que la activación de los receptores en las aferentes mencionadas propicia la disminución en la liberación de GABA evocada por la activación de los receptores D₁ (Nava-Asbell *et al.*, 2007). Efecto similar se ha encontrado al estimular a los receptores GABA_B presentes en las dendritas dopaminérgicas de la SNc (Westerink *et al.*, 1992).

Si como consecuencia de la liberación de GABA de las aferentes estriato-nigrales, se lleva a cabo la activación de los receptores GABA_B en las ubicaciones mencionadas, se podría paulatinamente detener la liberación de todos los neurotransmisores involucrados, deteniéndose el circuito.

Por otra parte, aunque según el modelo propuesto, la liberación palidal de GABA no participa en la interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA, es de mencionarse que las aferentes pálido-nigrales también expresan al receptor GABA_B (Boyes and Bolam, 2007) que fungiría como autorreceptor, disminuyendo la liberación del neurotransmisor.

Finalmente, es importante destacar la importancia de la modulación presináptica (glutamatérgica, GABAérgica y dopaminérgica) ejercida sobre la SNr, pues al ser este el núcleo integrador de la información dentro de los ganglios basales, los mecanismos que la integran están íntimamente relacionados con el control motor y los desórdenes de este como la enfermedad de Parkinson o de Huntingon.

10. CONCLUSIONES

- Los receptores D₃ de las aferentes subtálamo-nigrales participan en la interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA y se encuentran tónicamente activos.
- Los receptores D₄ presentes en las terminales pálido-nigrales se encuentran tónicamente activos, pero no participan en la interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA.
- La interacción recíproca glutamato/dopamina/GABA ocasionada por la liberación en sucesión de glutamato desde las aferentes subtálamo-nigrales; dopamina, desde las dendritas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta y GABA desde las aferentes estriato-nigrales, es independiente funcional y anatómicamente, de la liberación de GABA desde las aferentes pálido-nigrales.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Garcia, J., N. Hernandez-Chan, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2009). "D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat." *Neuropharmacology* **57**(7-8): 725-730.

Albin, R. L., R. L. Makowiec, Z. R. Hollingsworth, L. S. t. Dure, J. B. Penney and A. B. Young (1992). "Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study." *Neuroscience* **46**(1): 35-48.

Albin, R. L., A. B. Young and J. B. Penney (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." *Trends Neurosci* **12**(10): 366-375.

Alexander, G. E. and M. D. Crutcher (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." *Trends Neurosci* **13**(7): 266-271.

Altar, C. A. and K. Hauser (1987). "Topography of substantia nigra innervation by D1 receptor-containing striatal neurons." *Brain Res* **410**(1): 1-11.

Amalric, M., A. Ouagazzal, C. Baunez and A. Nieoullon (1994). "Functional interactions between glutamate and dopamine in the rat striatum." *Neurochem Int* **25**(2): 123-131.

Anderzhanova, E. and C. T. Wotjak (2013). "Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry." *Cell Tissue Res*.

Araneda, R. and G. Bustos (1989). "Modulation of dendritic release of dopamine by N-methyl-D-aspartate receptors in rat substantia nigra." *J Neurochem* **52**(3): 962-970.

Ariano, M. A. and D. R. Sibley (1994). "Dopamine receptor distribution in the rat CNS: elucidation using anti-peptide antisera directed against D1A and D3 subtypes." *Brain Res* **649**(1-2): 95-110.

Ariano, M. A., J. Wang, K. L. Noblett, E. R. Larson and D. R. Sibley (1997). "Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera." *Brain Res* **752**(1-2): 26-34.

Atherton, J. F. and M. D. Bevan (2005). "Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons in vitro." *J Neurosci* **25**(36): 8272-8281.

Audinot, V., A. Newman-Tancredi, A. Gobert, J. M. Rivet, M. Brocco, F. Lejeune, L. Gluck, I. Desposte, K. Bervoets, A. Dekeyne and M. J. Millan (1998). "A comparative in vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel dopamine D3 receptor antagonists (+)-S 14297, nafadotride, GR 103,691 and U 99194." *J Pharmacol Exp Ther* **287**(1): 187-197.

BIBLIOGRAFÍA

Avalos-Fuentes, A., S. Loya-Lopez, A. Flores-Perez, S. Recillas-Morales, H. Cortes, F. Paz-Bermudez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran (2013). "Presynaptic CaMKIIalpha modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca(2)(+) dependent manner." *Neuropharmacology* **71**: 273-281.

Bar-Gad, I., G. Morris and H. Bergman (2003). "Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia." *Prog Neurobiol* **71**(6): 439-473.

Baufreton, J., M. Garret, A. Rivera, A. de la Calle, F. Gonon, B. Dufy, B. Bioulac and A. Taupignon (2003). "D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance." *J Neurosci* **23**(3): 816-825.

Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." *Pharmacol Rev* **63**(1): 182-217.

Beckstead, R. M., V. B. Domesick and W. J. Nauta (1979). "Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat." *Brain Res* **175**(2): 191-217.

Benarroch, E. E. (2012). "GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications." *Neurology* **78**(8): 578-584.

Besson, M. J., A. M. Graybiel and M. A. Nastuk (1988). "[3H]SCH 23390 binding to D1 dopamine receptors in the basal ganglia of the cat and primate: delineation of striosomal compartments and pallidal and nigral subdivisions." *Neuroscience* **26**(1): 101-119.

Beurrier, C., P. Congar, B. Bioulac and C. Hammond (1999). "Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode." *J Neurosci* **19**(2): 599-609.

Bevan, M. D., J. P. Bolam and A. R. Crossman (1994). "Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat." *Eur J Neurosci* **6**(3): 320-334.

Bevan, M. D. and C. J. Wilson (1999). "Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons." *J Neurosci* **19**(17): 7617-7628.

Bibb, J. A., G. L. Snyder, A. Nishi, Z. Yan, L. Meijer, A. A. Fienberg, L. H. Tsai, Y. T. Kwon, J. A. Girault, A. J. Czernik, R. L. Haganir, H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and P. Greengard (1999). "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons." *Nature* **402**(6762): 669-671.

Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli and E. Martignoni (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* **62**(1): 63-88.

BIBLIOGRAFÍA

Bloom, F. E., D. J. Kupfer and A. C. o. Neuropsychopharmacology (1995). Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress : An Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, Raven Press.

Bokoch, G. M., T. Katada, J. K. Northup, M. Ui and A. G. Gilman (1984). "Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase." *J Biol Chem* **259**(6): 3560-3567.

Bolam, J. P., J. J. Hanley, P. A. Booth and M. D. Bevan (2000). "Synaptic organisation of the basal ganglia." *J Anat* **196 (Pt 4)**: 527-542.

Bordet, R., S. Ridray, J. C. Schwartz and P. Sokoloff (2000). "Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats." *Eur J Neurosci* **12**(6): 2117-2123.

Bowery, N. G., K. Parry, G. Goodrich, I. Ilinsky and K. Kultas-Ilinsky (1999). "Distribution of GABA(B) binding sites in the thalamus and basal ganglia of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*)." *Neuropharmacology* **38**(11): 1675-1682.

Boyes, J. and J. P. Bolam (2003). "The subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in the rat substantia nigra." *Eur J Neurosci* **18**(12): 3279-3293.

Boyes, J. and J. P. Bolam (2007). "Localization of GABA receptors in the basal ganglia." *Prog Brain Res* **160**: 229-243.

Bristow, L. J., M. S. Kramer, J. Kulagowski, S. Patel, C. I. Ragan and G. R. Seabrook (1997). "Schizophrenia and L-745,870, a novel dopamine D4 receptor antagonist." *Trends Pharmacol Sci* **18**(6): 186-188.

Carlsson, M. and A. Carlsson (1990). "Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease." *Trends Neurosci* **13**(7): 272-276.

Carter, C. J. (1982). "Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats." *Neuropharmacology* **21**(5): 379-383.

Cass, W. A. and N. R. Zahniser (1991). "Potassium channel blockers inhibit D2 dopamine, but not A1 adenosine, receptor-mediated inhibition of striatal dopamine release." *J Neurochem* **57**(1): 147-152.

Catania, M. V., H. De Socarraz, J. B. Penney and A. B. Young (1994). "Metabotropic glutamate receptor heterogeneity in rat brain." *Mol Pharmacol* **45**(4): 626-636.

BIBLIOGRAFÍA

Cohen, B. M., D. J. Ennulat, F. Centorrino, S. Matthyse, H. Konieczna, H. M. Chu and S. Cherkerzian (1999). "Polymorphisms of the dopamine D4 receptor and response to antipsychotic drugs." *Psychopharmacology (Berl)* **141**(1): 6-10.

Cortes, H., F. Paz, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2010). "GABA(B) receptors modulate depolarization-stimulated [(3)H]glutamate release in slices of the pars reticulata of the rat substantia nigra." *Eur J Pharmacol* **649**(1-3): 161-167.

Cruz-Trujillo, R., A. Avalos-Fuentes, C. Rangel-Barajas, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, E. Escartin-Perez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran (2013). "D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat." *Neuropharmacology* **67**: 370-378.

Chemel, B. R., B. L. Roth, B. Armbruster, V. J. Watts and D. E. Nichols (2006). "WAY-100635 is a potent dopamine D4 receptor agonist." *Psychopharmacology (Berl)* **188**(2): 244-251.

Choi, E. Y., D. Jeong, K. W. Park and J. H. Baik (1999). "G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **256**(1): 33-40.

De Camilli, P., D. Macconi and A. Spada (1979). "Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas." *Nature* **278**(5701): 252-254.

De Mei, C., M. Ramos, C. Iitaka and E. Borrelli (2009). "Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors." *Curr Opin Pharmacol* **9**(1): 53-58.

Deniau, J. M., S. T. Kitai, J. P. Donoghue and I. Grofova (1982). "Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. An electrophysiological and morphological study." *Exp Brain Res* **47**(1): 105-113

Deniau, J. M., P. Mailly, N. Maurice and S. Charpier (2007). "The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output." *Prog Brain Res* **160**: 151-172.

Di Chiara, G., M. L. Porceddu, M. Morelli, M. L. Mulas and G. L. Gessa (1979). "Evidence for a gabaergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat." *Brain Res* **176**(2): 273-284.

Diaz, J., D. Levesque, C. H. Lammers, N. Griffon, M. P. Martres, J. C. Schwartz and P. Sokoloff (1995). "Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain." *Neuroscience* **65**(3): 731-745.

Dopico, J. G., T. Gonzalez-Hernandez, I. M. Perez, I. G. Garcia, A. M. Abril, J. O. Inchausti and M. Rodriguez Diaz (2006). "Glycine release in the substantia nigra: Interaction with glutamate and GABA." *Neuropharmacology* **50**(5): 548-557.

BIBLIOGRAFÍA

Elmhurst, J. L., Z. Xie, B. F. O'Dowd and S. R. George (2000). "The splice variant D3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization." *Brain Res Mol Brain Res* **80**(1): 63-74.

Elsworth, J. D. and R. H. Roth (1997). "Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease." *Exp Neurol* **144**(1): 4-9.

Erlj, D., J. Acosta-Garcia, M. Rojas-Marquez, B. Gonzalez-Hernandez, E. Escartin-Perez, J. Aceves and B. Floran (2012). "Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity." *Neuropharmacology* **62**(2): 1111-1118.

Fahn, S. (1987). "Systemic therapy of dystonia." *Can J Neurol Sci* **14**(3 Suppl): 528-532.

Fiorentini, C., C. Busi, E. Gorruso, C. Gotti, P. Spano and C. Missale (2008). "Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization." *Mol Pharmacol* **74**(1): 59-69.

Floran, B., J. Aceves, A. Sierra and D. Martinez-Fong (1990). "Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat." *Neurosci Lett* **116**(1-2): 136-140.

Floran, B., L. Floran, D. Erlj and J. Aceves (2004a). "Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus." *Neuropharmacology* **46**(4): 497-503.

Floran, B., L. Floran, D. Erlj and J. Aceves (2004b). "Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced [3H]GABA release in the rat subthalamic nucleus." *Eur J Pharmacol* **498**(1-3): 97-102.

Flores, G., J. J. Liang, A. Sierra, D. Martinez-Fong, R. Quirion, J. Aceves and L. K. Srivastava (1999). "Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography." *Neuroscience* **91**(2): 549-556.

Galvan, A. and T. Wichmann (2008). "Pathophysiology of parkinsonism." *Clin Neurophysiol* **119**(7): 1459-1474.

Gasser, T., B. Muller-Myhsok, Z. K. Wszolek, A. Durr, J. R. Vaughan, V. Bonifati, G. Meo, B. Bereznoi, R. Oehlmann, Y. Agid, A. Brice and N. Wood (1997). "Genetic complexity and Parkinson's disease." *Science* **277**(5324): 388-389; author reply 389.

Gerfen, C. R. (2000). "Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways." *Trends Neurosci* **23**(10 Suppl): S64-70.

BIBLIOGRAFÍA

Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. and D. R. Sibley (1990). "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons." *Science* **250**(4986): 1429-1432.

Gerfen, C. R., K. A. Keefe and E. B. Gauda (1995). "D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons." *J Neurosci* **15**(12): 8167-8176.

Gerfen, C. R. and D. J. Surmeier (2011). "Modulation of striatal projection systems by dopamine." *Annu Rev Neurosci* **34**: 441-466.

Giros, B., M. P. Martres, C. Pilon, P. Sokoloff and J. C. Schwartz (1991). "Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing." *Biochem Biophys Res Commun* **176**(3): 1584-1592.

Giros, B., P. Sokoloff, M. P. Martres, J. F. Riou, L. J. Emorine and J. C. Schwartz (1989). "Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms." *Nature* **342**(6252): 923-926.

Glase, S. A., H. C. Akunne, L. M. Georgic, T. G. Heffner, R. G. MacKenzie, P. J. Manley, T. A. Pugsley and L. D. Wise (1997). "Substituted [(4-phenylpiperazinyl)-methyl]benzamides: selective dopamine D4 agonists." *J Med Chem* **40**(12): 1771-1772.

Gould, E., N. J. Woolf and L. L. Butcher (1989). "Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei." *Neuroscience* **28**(3): 611-623.

Guihen, E. and W. T. O'Connor (2009). "Current separation and detection methods in microdialysis the drive towards sensitivity and speed." *Electrophoresis* **30**(12): 2062-2075.

Hajos, M. and S. A. Greenfield (1993). "Topographic heterogeneity of substantia nigra neurons: diversity in intrinsic membrane properties and synaptic inputs." *Neuroscience* **55**(4): 919-934.

Hattori, T., P. L. McGeer, H. C. Fibiger and E. G. McGeer (1973). "On the source of GABA-containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic autoradiographic and biochemical studies." *Brain Res* **54**: 103-114.

Hatzipetros, T. and B. K. Yamamoto (2006). "Dopaminergic and GABAergic modulation of glutamate release from rat subthalamic nucleus efferents to the substantia nigra." *Brain Res* **1076**(1): 60-67.

BIBLIOGRAFÍA

Hernandez, A., O. Ibanez-Sandoval, A. Sierra, R. Valdiosera, D. Tapia, V. Anaya, E. Galarraga, J. Bargas and J. Aceves (2006). "Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors." *J Neurophysiol* **96**(6): 2877-2888.

Herrera-Marschitz, M., Z. B. You, M. Goiny, J. J. Meana, R. Silveira, O. V. Godukhin, Y. Chen, S. Espinoza, E. Pettersson, C. F. Loidl, G. Lubec, K. Andersson, I. Nylander, L. Terenius and U. Ungerstedt (1996). "On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis." *J Neurochem* **66**(4): 1726-1735.

Holmes, A., J. E. Lachowicz and D. R. Sibley (2004). "Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes." *Neuropharmacology* **47**(8): 1117-1134.

Huot, P., T. H. Johnston, J. B. Koprach, S. H. Fox and J. M. Brotchie (2013). "The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease." *Pharmacol Rev* **65**(1): 171-222.

Ibanez-Sandoval, O., A. Hernandez, B. Floran, E. Galarraga, D. Tapia, R. Valdiosera, D. Erlij, J. Aceves and J. Bargas (2006). "Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors." *J Neurophysiol* **95**(3): 1800-1811.

Iribe, Y., K. Moore, K. C. Pang and J. M. Tepper (1999). "Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro." *J Neurophysiol* **82**(2): 925-933.

Iversen, S. D. and L. L. Iversen (2007). "Dopamine: 50 years in perspective." *Trends Neurosci* **30**(5): 188-193.

Justice, J. B., Jr. (1993). "Quantitative microdialysis of neurotransmitters." *J Neurosci Methods* **48**(3): 263-276.

Karpa, K. D., R. Lin, N. Kabbani and R. Levenson (2000). "The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors." *Mol Pharmacol* **58**(4): 677-683.

Katada, T., G. M. Bokoch, J. K. Northup, M. Ui and A. G. Gilman (1984). "The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein." *J Biol Chem* **259**(6): 3568-3577.

Kemp, J. M. and T. P. Powell (1971). "The synaptic organization of the caudate nucleus." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **262**(845): 403-412.

BIBLIOGRAFÍA

Khan, Z. U., A. Gutierrez, R. Martin, A. Penafiel, A. Rivera and A. De La Calle (1998). "Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain." *J Comp Neurol* **402**(3): 353-371.

Kita, H. and S. T. Kitai (1987). "Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method." *J Comp Neurol* **260**(3): 435-452.

Kita, H. and S. T. Kitai (1988). "Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations." *Brain Res* **447**(2): 346-352.

Kornhuber, J., J. S. Kim, M. E. Kornhuber and H. H. Kornhuber (1984). "The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantia nigra following frontal cortex ablation in the rat." *Brain Res* **322**(1): 124-126.

Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag and P. C. Sternweis (1998). "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13." *Science* **280**(5372): 2109-2111.

Kreiss, D. S., C. W. Mastropietro, S. S. Rawji and J. R. Walters (1997). "The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease." *J Neurosci* **17**(17): 6807-6819.

Kreitzer, A. C. (2009). "Physiology and pharmacology of striatal neurons." *Annu Rev Neurosci* **32**: 127-147.

LaHoste, G. J., J. M. Swanson, S. B. Wigal, C. Glabe, T. Wigal, N. King and J. L. Kennedy (1996). "Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder." *Mol Psychiatry* **1**(2): 121-124.

Leung, P. W., C. C. Lee, S. F. Hung, T. P. Ho, C. P. Tang, S. L. Kwong, S. Y. Leung, S. T. Yuen, F. Lieh-Mak, J. Oosterlaan, D. Grady, A. Harxhi, Y. C. Ding, H. C. Chi, P. Flodman, S. Schuck, M. A. Spence, R. Moyzis and J. Swanson (2005). "Dopamine receptor D4 (DRD4) gene in Han Chinese children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): increased prevalence of the 2-repeat allele." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **133B**(1): 54-56.

Lew, J. Y., A. Garcia-Espana, K. Y. Lee, K. D. Carr, M. Goldstein, J. W. Haycock and E. Meller (1999). "Increased site-specific phosphorylation of tyrosine hydroxylase accompanies stimulation of enzymatic activity induced by cessation of dopamine neuronal activity." *Mol Pharmacol* **55**(2): 202-209.

Liu, F. C. and A. M. Graybiel (1996). "Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum." *Neuron* **17**(6): 1133-1144.

BIBLIOGRAFÍA

Liu, K., C. Bergson, R. Levenson and C. Schmauss (1994). "On the origin of mRNA encoding the truncated dopamine D3-type receptor D3nf and detection of D3nf-like immunoreactivity in human brain." *J Biol Chem* **269**(46): 29220-29226.

Logothetis, D. E., Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer and D. E. Clapham (1987). "The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart." *Nature* **325**(6102): 321-326.

Ma, Y. C., J. Huang, S. Ali, W. Lowry and X. Y. Huang (2000). "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins." *Cell* **102**(5): 635-646.

Marien, M., J. Brien and K. Jhamandas (1983). "Regional release of [³H]dopamine from rat brain in vitro: effects of opioids on release induced by potassium, nicotine, and L-glutamic acid." *Can J Physiol Pharmacol* **61**(1): 43-60.

Matuszewich, L. and B. K. Yamamoto (1999). "Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra." *Synapse* **32**(1): 29-36.

Mengod, G., M. Pompeiano, M. I. Martinez-Mir and J. M. Palacios (1990). "Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites." *Brain Res* **524**(1): 139-143.

Mintz, I., C. Hammond, B. Guibert and V. Leviel (1986). "Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra." *Brain Res* **376**(2): 406-408.

Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." *Physiol Rev* **78**(1): 189-225.

Mohr, P., M. Decker, C. Enzensperger and J. Lehmann (2006). "Dopamine/serotonin receptor ligands. 12(1): SAR studies on hexahydro-dibenz[d,g]azecines lead to 4-chloro-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]azecin-3-ol, the first picomolar D₅-selective dopamine-receptor antagonist." *J Med Chem* **49**(6): 2110-2116.

Monsma, F. J., Jr., L. D. McVittie, C. R. Gerfen, L. C. Mahan and D. R. Sibley (1989). "Multiple D₂ dopamine receptors produced by alternative RNA splicing." *Nature* **342**(6252): 926-929.

Mrzljak, L., C. Bergson, M. Pappy, R. Huff, R. Levenson and P. S. Goldman-Rakic (1996). "Localization of dopamine D₄ receptors in GABAergic neurons of the primate brain." *Nature* **381**(6579): 245-248.

Nava-Asbell, C., F. Paz-Bermudez, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2007). "GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D₁ receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata." *Neuropharmacology* **53**(5): 631-637.

BIBLIOGRAFÍA

Neumeyer, J. L., N. S. Kula, J. Bergman and R. J. Baldessarini (2003). "Receptor affinities of dopamine D1 receptor-selective novel phenylbenzazepines." *Eur J Pharmacol* **474**(2-3): 137-140.

Neve, K. A., J. K. Seamans and H. Trantham-Davidson (2004). "Dopamine receptor signaling." *J Recept Signal Transduct Res* **24**(3): 165-205.

Obeso, J. A., C. Marin, C. Rodriguez-Oroz, J. Blesa, B. Benitez-Temino, J. Mena-Segovia, M. Rodriguez and C. W. Olanow (2008a). "The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations." *Ann Neurol* **64 Suppl 2**: S30-46.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F. J. Blesa, J. Guridi, C. Marin and M. Rodriguez (2008b). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." *Mov Disord* **23 Suppl 3**: S548-559.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, M. Rodriguez, J. Arbizu and J. M. Gimenez-Amaya (2002). "The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms." *News Physiol Sci* **17**: 51-55.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, M. Rodriguez, J. L. Lanciego, J. Artieda, N. Gonzalo and C. W. Olanow (2000). "Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease." *Trends Neurosci* **23**(10 Suppl): S8-19.

Page, K. M., C. Canti, G. J. Stephens, N. S. Berrow and A. C. Dolphin (1998). "Identification of the amino terminus of neuronal Ca²⁺ channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation." *J Neurosci* **18**(13): 4815-4824.

Parent, A. and L. N. Hazrati (1995a). "Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop." *Brain Res Brain Res Rev* **20**(1): 91-127.

Parent, A. and L. N. Hazrati (1995b). "Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry." *Brain Res Brain Res Rev* **20**(1): 128-154.

Paxinos, G. and C. Watson (1998). The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates, Academic Press, Incorporated.

Pazos, A., A. Probst and J. M. Palacios (1987). "Serotonin receptors in the human brain--IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors." *Neuroscience* **21**(1): 123-139.

Perkins, M. N. and T. W. Stone (1980). "Subthalamic projections to the globus pallidus: an electrophysiological study in the rat." *Exp Neurol* **68**(3): 500-511.

BIBLIOGRAFÍA

Pierce, K. L., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639-650.

Pinkerton, T. C. (1991). "High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection." *J Chromatogr* **544**(1-2): 13-23.

Pitcher, J. A., N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz (1998). "G protein-coupled receptor kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 653-692.

Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe and R. L. Nussbaum (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science* **276**(5321): 2045-2047.

Pugsley, T. A., M. D. Davis, H. C. Akunne, R. G. MacKenzie, Y. H. Shih, G. Damsma, H. Wikstrom, S. Z. Whetzel, L. M. Georgic, L. W. Cooke and et al. (1995). "Neurochemical and functional characterization of the preferentially selective dopamine D3 agonist PD 128907." *J Pharmacol Exp Ther* **275**(3): 1355-1366.

Qin, N., D. Platano, R. Olcese, E. Stefani and L. Birnbaumer (1997). "Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8866-8871.

Quiroz-Gonzalez, S., R. E. Escartin-Perez, F. Paz-Bermudez, B. Segura-Alegria, C. Reyes-Legorreta, J. C. Guadarrama-Olmos, B. Floran-Garduno and I. Jimenez-Estrada (2013). "Endogenous content and release of [(3)H]-GABA and [(3)H]-glutamate in the spinal cord of chronically undernourished rat." *Neurochem Res* **38**(1): 23-31.

Riederer, P., K. W. Lange, J. Kornhuber and W. Danielczyk (1992). "Glutamatergic-dopaminergic balance in the brain. Its importance in motor disorders and schizophrenia." *Arzneimittelforschung* **42**(2A): 265-268.

Rinvik, E. and I. Grofova (1970). "Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat." *Exp Brain Res* **11**(3): 229-248.

Rodbell, M., L. Birnbaumer, S. L. Pohl and H. M. Krans (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action." *J Biol Chem* **246**(6): 1877-1882.

Romo-Parra, H., J. Aceves and R. Gutierrez (2005). "Tonic modulation of inhibition by dopamine D4 receptors in the rat hippocampus." *Hippocampus* **15**(2): 254-259.

BIBLIOGRAFÍA

Rosales, M. G., G. Flores, S. Hernandez, D. Martinez-Fong and J. Aceves (1994). "Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat." *Brain Res* **645**(1-2): 335-337.

Rosales, M. G., D. Martinez-Fong, R. Morales, A. Nunez, G. Flores, J. L. Gongora-Alfaro, B. Floran and J. Aceves (1997). "Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study." *Neuroscience* **80**(3): 803-810.

Saitoh, K., T. Isa and K. Takakusaki (2004). "Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats." *Eur J Neurosci* **19**(9): 2399-2409.

Santiago, M. and B. H. Westerink (1991). "The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autoreceptors." *Eur J Pharmacol* **204**(1): 79-85.

Santini, F., I. Gaidarov and J. H. Keen (2002). "G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery." *J Cell Biol* **156**(4): 665-676.

Savasta, M., A. Dubois, J. Benavides and B. Scatton (1986a). "Different neuronal location of [3H]SCH 23390 binding sites in pars reticulata and pars compacta of the substantia nigra in the rat." *Neurosci Lett* **72**(3): 265-271.

Savasta, M., A. Dubois and B. Scatton (1986b). "Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390." *Brain Res* **375**(2): 291-301.

Seeman, P. and H. H. Van Tol (1994). "Dopamine receptor pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* **15**(7): 264-270.

Shen, K. Z. and S. W. Johnson (2012). "Regulation of polysynaptic subthalamonigral transmission by D2, D3 and D4 dopamine receptors in rat brain slices." *J Physiol* **590**(Pt 10): 2273-2284.

Shin, R. M., M. Masuda, M. Miura, H. Sano, T. Shirasawa, W. J. Song, K. Kobayashi and T. Aosaki (2003). "Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons." *J Neurosci* **23**(37): 11662-11672.

Sibley, D. R. (1999). "New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 313-341.

Sidhu, A. (1998). "Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins: Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling." *Mol Neurobiol* **16**(2): 125-134.

BIBLIOGRAFÍA

Smith, Y. and J. P. Bolam (1989). "Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat." *Brain Res* **493**(1): 160-167.

Smith, Y. and J. P. Bolam (1991). "Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study." *Neuroscience* **44**(1): 45-73.

Smith, Y., A. Charara and A. Parent (1996). "Synaptic innervation of midbrain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey." *J Comp Neurol* **364**(2): 231-253.

Smith, Y., L. N. Hazrati and A. Parent (1990). "Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method." *J Comp Neurol* **294**(2): 306-323.

Smith, Y. and J. Z. Kieval (2000). "Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia." *Trends Neurosci* **23**(10 Suppl): S28-33.

Smith, Y. and A. Parent (1988). "Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity." *Brain Res* **453**(1-2): 353-356.

Smrcka, A. V., J. R. Hepler, K. O. Brown and P. C. Sternweis (1991). "Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq." *Science* **251**(4995): 804-807.

Sokoloff, P., B. Giros, M. P. Martres, M. L. Bouthenet and J. C. Schwartz (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics." *Nature* **347**(6289): 146-151.

Steinbusch, H. W. (1981). "Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals." *Neuroscience* **6**(4): 557-618.

Stone, T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." *Pharmacol Rev* **45**(3): 309-379.

Stoof, J. C. and J. W. Kebabian (1981). "Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum." *Nature* **294**(5839): 366-368.

Sunahara, R. K., H. C. Guan, B. F. O'Dowd, P. Seeman, L. G. Laurier, G. Ng, S. R. George, J. Torchia, H. H. Van Tol and H. B. Niznik (1991). "Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1." *Nature* **350**(6319): 614-619.

Surmeier, D. J., W. J. Song and Z. Yan (1996). "Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons." *J Neurosci* **16**(20): 6579-6591.

BIBLIOGRAFÍA

Tepper, J. M. and J. P. Bolam (2004). "Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons." *Curr Opin Neurobiol* **14**(6): 685-692.

Tepper, J. M., L. P. Martin and D. R. Anderson (1995). "GABAA receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons." *J Neurosci* **15**(4): 3092-3103.

Tepper, J. M., B. C. Sun, L. P. Martin and I. Creese (1997). "Functional roles of dopamine D2 and D3 autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown in vivo." *J Neurosci* **17**(7): 2519-2530.

Timmerman, W. and B. H. Westerink (1997). "Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify?" *Synapse* **27**(3): 242-261.

Tulloch, I. F., G. W. Arbuthnott and A. K. Wright (1978). "Topographical organization of the striatonigral pathway revealed by anterograde and retrograde neuroanatomical tracing techniques." *J Anat* **127**(Pt 2): 425-441.

Ungerstedt, U. and A. Hallstrom (1987). "In vivo microdialysis--a new approach to the analysis of neurotransmitters in the brain." *Life Sci* **41**(7): 861-864.

Villardaga, J. P., M. Bunemann, T. N. Feinstein, N. Lambert, V. O. Nikolaev, S. Engelhardt, M. J. Lohse and C. Hoffmann (2009). "GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells." *Mol Endocrinol* **23**(5): 590-599.

Wallman, M. J., D. Gagnon and M. Parent (2011). "Serotonin innervation of human basal ganglia." *Eur J Neurosci* **33**(8): 1519-1532.

Wassef, M., A. Berod and C. Sotelo (1981). "Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde degeneration." *Neuroscience* **6**(11): 2125-2139.

Welsh, G. I., D. A. Hall, A. Warnes, P. G. Strange and C. G. Proud (1998). "Activation of microtubule-associated protein kinase (Erk) and p70 S6 kinase by D2 dopamine receptors." *J Neurochem* **70**(5): 2139-2146.

Wess, J. (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." *FASEB J* **11**(5): 346-354.

Westerink, B. H., M. Santiago and J. B. De Vries (1992). "The release of dopamine from nerve terminals and dendrites of nigrostriatal neurons induced by excitatory amino acids in the conscious rat." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **345**(5): 523-529.

BIBLIOGRAFÍA

Windels, F., N. Bruet, A. Poupard, N. Urbain, G. Chouvet, C. Feuerstein and M. Savasta (2000). "Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat." *Eur J Neurosci* **12**(11): 4141-4146.

Woolf, N. J. and L. L. Butcher (1986). "Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain." *Brain Res Bull* **16**(5): 603-637.

Wu, H. Q., R. Schwarcz and P. D. Shepard (1994). "Excitatory amino acid-induced excitation of dopamine-containing neurons in the rat substantia nigra: modulation by kynurenic acid." *Synapse* **16**(3): 219-230.

Xu, M., R. Moratalla, L. H. Gold, N. Hiroi, G. F. Koob, A. M. Graybiel and S. Tonegawa (1994). "Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses." *Cell* **79**(4): 729-742.

Yung, K. K., A. D. Smith, A. I. Levey and J. P. Bolam (1996). "Synaptic connections between spiny neurons of the direct and indirect pathways in the neostriatum of the rat: evidence from dopamine receptor and neuropeptide immunostaining." *Eur J Neurosci* **8**(5): 861-869.

Zapata, A., V. I. Chefer, S. Parrot and L. Denoroy (2013). "Detection and quantification of neurotransmitters in dialysates." *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 7**: Unit7 4.

Zhou, F. M. and C. R. Lee (2011). "Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons." *Neuroscience* **198**: 69-94.

Zhuang, X., L. Belluscio and R. Hen (2000). "G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling." *J Neurosci* **20**(16): RC91.