CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

"PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES D3 Y D4 SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESTIMULADA POR DOPAMINA EN LA RATA"

TESIS

Que presenta

BARUC CAMPOS CAMPOS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de tesis: BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

México, D.F. **Diciembre del 2012**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 4 DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D.C. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO Y GRACIAS AL DONATIVO OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) No. 152326.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este proyecto.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño por permitirme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su dirección.

Y de manera general a todos los integrantes del laboratorio 4, doctores, auxiliares, técnicos, alumnos y compañeros, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN…….1
ABSTRAC……..2
ABREVIATURAS…….3
1. INTRODUCCIÓN …….…5
1.1 Enfermedad de Parkinson …….……....5
1.2 Patofisiología de la enfermedad de Parkinson…….……..5
1.3 Terapéutica…….……6
1.1.1 Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad…….…..7
1.1.2 Etiología…….…..7
1.1.3 Terapéutica…….…..8
2. DOPAMINA……...8
2.1 Síntesis de dopamina…….9
2.2 Receptores dopaminérgicos……...……..10
2.2.1 Receptores D1……..10
2.2.2 Receptores D2……..12
2.2.3 Receptores D3……..13
2.2.4 Receptores D4……..15
2.2.5 Receptores D5……..17
3. LOS GANGLIOS BASALES Y EL CONTROL MOTOR……...17
3.1 Ganglios basales……...17
3.2 Organización funcional de los ganglios basales…….....18
3.3 Ganglios basales y movimiento; vías estriatopalidales…….....19
4. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINERGICOS
SOBRE EL CONTROL MOTOR (RATONES KNOCKOUT)……20
4.1 Knockout del receptor D1……....20
4.2 Knockout del receptor D2……....21
4.3 Knockout del receptor D3……....21
4.4 Knockout del receptor D4……....22
4.5 Knockout del receptor D5……....22

5. MODELO CLÁSICO DE ORGANIZACIÓN FUNCIONAL
DE LOS GANGLIOS BASALES…….24
5.1 Localización de los receptores D3
en el circuito de los ganglios basales……...…25
5.2 Localización de los receptores D4
en el circuito de los ganglios basales…….....26
5.3 Circuito de los ganglios basales con la
presencia de los receptores D1,D2,D3 y D4……...….29
6. PAPEL FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES D3 Y D4 SOBRE
LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA……..30
6.1 Papel funcional del receptor D3……...30
6.2 Papel funcional del receptor D4……...32
7. JUSTIFICACIÓN…….....33
8. HIPÓTESIS…….....33
9. OBJETIVO GENERAL……....33
9.1 Objetivos específicos……...34
10. MATERIAL Y MÉTODOS……..35
10.1 Animales…….....35
10.2 Fármacos…….....35
10.3 Actividad Locomotora……...36
10.4 Metodología……...36
10.4.1 Tono dopaminérgico incrementado con anfetamina……...37
10.4.2 Tono dopaminérgico depletado con reserpina…….37
11. RESULTADOS…….....38
11.1 TONO DOPAMINÉRGICO INCREMENTADO
CON ANFETAMINA……...38
11.1.1 Efecto del antagonismo de los receptores D1, D2, D3 y D4
sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina……..38
11.1.2 Interacciones de los receptores D1/D3, D1/D4 y D2/D4
sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina……..41

11.1.3 Efecto de la activación indirecta de los receptores D3 y D4 por dopamina endógena en condiciones de sobreactivación de los receptores D1…….....45

11.2 TONO DOPAMINÉRGICO DEPLETADO CON RESERPINA…….46

11.2.1 Efecto de la activación selectiva de los receptores D1, D3 y D4 en ratas previamente reserpinizadas…….....46

12 DISCUSIÓN DE RESULTADOS……49

13 CONCLUSIONES…….55

14 REFERENCIAS…….56

RESUMEN

Los receptores dopaminérgicos D3 y D4 han sido relacionados con una serie de enfermedades neuropsiquiátricas entre las cuales destacan la Enfermedad de Parkinson (EP) y el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH), en las cuales se generan importantes cambios en la conducta motora y el papel de estos receptores en la patofisiología de dichos trastorno es poco entendida. De ahí la importancia de conocer el papel funcional de los receptores D3 y D4 sobre la conducta motora (bastante controversial hasta la fecha) para poder comprender su función en el desarrollo o sintomatología de los diversos trastornos neuropsiquiátricos en los que están relacionados.

Por medio de la estrategia de modificar el tono dopaminérgico incrementándolo con anfetamina y antagonizando a los receptores D1, D2, D3 y D4, o la estrategia opuesta depletando el tono dopaminérgico con reserpina y activando selectivamente a los receptores D1, D2, D3 y D4 pudimos determinar un efecto modulador inhibitorio del receptor D4 sobre los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1 en ambas condiciones; con tono dopaminérgico incrementado y depletado.

Por lo que respecta al receptor D3 evidenciamos un efecto inhibitorio sobre los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1 en condiciones en las que el tono dopaminérgico fue incrementado con anfetamina, pero a su vez de manera muy interesante un efecto potenciador sobre la actividad locomotora tras la coactivación de ambos receptores D1 y D3 en condiciones en las que el tono dopaminérgico fue depletado con reserpina.

También evidenciamos que los efectos estimulatorios de la anfetamina se deben básicamente a la activación del receptor D1 ya que cuando se bloquea con su antagonista selectivo el SCH 23390 la actividad locomotora regresa a niveles basales. Contrario a lo que ocurre tras bloquear al receptor D2 con su antagonista selectivo el L 741 626 en donde no se observan cambios significativos con respecto a la respuesta a anfetamina por lo cual especulamos que los efectos moduladores de los receptores D3 y D4 sobre la actividad locomotora se dan sobre los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1.

A su vez también proponemos un posible mecanismo de acción de los psicoestimulantes en el trastorno por déficit de atención con hiperactividad en base al experimento donde sobre activamos a los receptores D1 con una dosis alta de su agonista selectivo SKF38393 a 10mg/kg i.p. y 10 minutos después administramos anfetamina a 1mg/kg i.p. y pudimos mostrar la activación de los receptores D3 y D4 por la dopamina endógena liberada por la anfetamina y su efecto inhibitorio sobre la activación del receptor D1 el cual es disminuir la actividad locomotora, resultados que se pueden extrapolar al mecanismo de acción de los psicoestimulantes en los niños con TDAH.

ABSTRAC

The D3 and D4 dopamine receptors have been related to a number of neuropsychiatric disorders including Parkinson's disease (PD) and Attention Deficit Disorder with Hyperactivity (ADHD), in which exits significant changes on motor behavior, but the role of these receptors in the pathophysiology is poorly understood. Hence the importance of understanding the functional role of D3 and D4 receptors on motor behavior (quite controversial to date) in order to understand their role in the development and symptoms of various neuropsychiatric disorders that are related.

Using the strategy of modifying the dopaminergic tone increased with amphetamine and antagonizing receptors D1, D2, D3 and D4, and the opposite strategy depleting dopaminergic tone with reserpine and selectively activating receptors D1, D2, D3 and D4 we show a modulator inhibitory effect on the D4 receptor stimulatory effects of D1 receptor activation in both conditions, with increased dopaminergic tone and depleted.

With regard the D3 receptor we show an inhibitory effect on the stimulatory effects of D1 receptor activation in conditions in which the dopaminergic tone was increased with amphetamine, but turn a very interesting a potentiating effect on locomotor activity after coactivation of both D1 and D3 receptors in conditions in which the dopaminergic tone was depleted with reserpine.

Also we found that the stimulatory effects of amphetamine are basically due to D1 receptor activation since when was blocked with selective antagonist SCH 23390, the locomotor activity returns to baseline levels. Contrary to what occurs after blocking the D2 receptor with the selective antagonist L 741,626 where not significant changes regarding the response to amphetamine, thus we speculate that the modulatory effects of D3 and D4 receptors on locomotor activity occur on the stimulatory effects of D1 receptor activation.

In turn we also propose a possible mechanism of action of psychostimulants in attention deficit disorder with hyperactivity based on the experiment where we activate the D1 receptors with a high dose of the selective agonist SKF38393 10mg/kg ip and 10 minutes later amphetamine administered to 1mg/kg ip and we show the activation of D3 and D4 receptors by endogenous dopamine released by amphetamine and its inhibitory effect on receptor activation D1 which is a decrease of locomotor activity, results that can be extrapolated to the mechanism of action of psychostimulants in childrens with ADHD.

ABREVIATURAS

EP	Enfermedad de Parkinson
TDAH	Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
6-OHDA	6-hidroxidopamina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridona
ADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
MAO	Monoamino oxidasa
COMT	Catecol –O – metiltransferasa
EEG	Electroencefalograma
PET	Tomografía de emisión de positrones
fRMN	Resonancia Magnética funcional
DAT	Gen del transportador de dopamina
NET	Gen del transportador de norepinefrina
MPD	Metilfenidato
DA	Dopamina
TH	Tirosina Hidroxilasa
VNAT	Número Variable de Repeticiones en Tándem
RD1	Receptor dopaminérgico D1
RD2	Receptor dopaminérgico D2
RD3	Receptor dopaminérgico D3
RD4	Receptor dopaminérgico D4
RD5	Receptor dopaminérgico D5
D3nf	Receptor dopaminérgico D3 no funcional
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AC	Adenilato ciclasa
GB	Ganglios Basales
SNr	Sustancia Nigra Reticulada
SNc	Sustancia Nigra Compacta

CPu	Caudado- putamen
STN	Nucleo subtalámico
GPi	Globo Pálido Interno
GPe	Globo Pálido Externo
NAc	Núcleo Accumbens
NEMs	Neuronas Espinosas Medianas
PKA	Protein cinasa A
PLC	Fosfolipasa C
GABA	Ácido γ aminobutírico
[^{3}H]GABA	Ácido γ aminobutírico marcado radiactivamente
K.O.	Ratones knockout
FRET	Estudio de transferencia de energía fluorescente
BRET	Estudio de transferencia de energía bioluminiscente
CAMKII	Cinasa de calcio calmodulina
Min	Minutos
V.S.	Versus
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

1. INTRODUCCIÓN

Los receptores D3 y D4 presentan una estrecha relación con la patofisiología de diversos trastornos neuropsiquiátricos entre los cuales destacan la Enfermedad de Parkinson (EP) y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAD) los cuales presentan importantes cambios en la conducta motora.

1.1 Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común relacionada con la edad (después del Alzheimer) descrita por primera vez por el médico ingles James Parkinson en 1817, la cual se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra Compacta (SNc), lo cual provoca la incapacidad paulatina de realizar movimientos voluntarios. Entre los principales síntomas se encuentran el temblor en reposo, rigidez y bradiscinecia (lentitud en los movimientos), así como alteraciones en el equilibrio, depresión y en estadios tardíos demencia. Es una enfermedad progresiva que afecta en promedio a personas mayores de 50 años con una incidencia de 20/100,000 y que a su vez aumenta marcadamente con la edad 120/100,000 en mayores de 70 años (William Dauer, et al. 2003). En México la incidencia estimada es de 50/100,000 habitantes puede padecerla (http://www.innn.salud.org.mx).

1.2 Patofisiología de la Enfermedad de Parkinson

La principal característica de esta enfermedad es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (~80%) de la SNc que inervan considerablemente al núcleo estriado (caudado-putamen), sin embargo, la degeneración neuronal se extiende más allá de las neuronas de la SNc encontrándose también perdida de las neuronas noradrenérgicas (locus coeruleus), serotonérgicas (raphe) y colinérgicas (núcleo basal de Meynert), así como en la corteza cerebral (cingulata y entorinal), a su vez se han encontrado diversas proteínas alteradas como la α-sinucleína, parkina y ubiquitina en todas las regiones cerebrales afectadas (Forno, 1996; Spillantini, et al., 1998) que participan en la neurodegeneración.

Hasta la fecha la etiología de esta enfermedad es desconocida y se han relacionado desde toxinas ambientales hasta factores genéticos así como generación de especies reactivas de oxigeno (ROS) a partir del metabolismo de dopamina que promueve apoptosis (Cohen, 1984). Se han estudiado los diversos cambios neuroquímicos y patofisiológicos en tejidos postmortem de pacientes con la EP y mediante el uso de modelos animales los cuales replican fielmente lo que ocurre en el humano, como los roedores tratados con las toxinas 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o la 1-metil-4-fenil-1,2,3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), así como también en primates tratados con MPTP (Burns, et al., 1983; Forno, et al., 1993).

1.3 Terapéutica

Hasta la fecha el tratamiento más efectivo y con menores efectos secundarios es la terapia de remplazo con L-DOPA la cual disminuye la bradicinecia y la rigidez presentes en la EP, se administra junto con carbidopa que es un inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (ADC) lo que permite que la L-DOPA no se degrade en la periferia y llegue mayor cantidad a sistema nervioso central para poder ser metabolizada a dopamina, sin embargo el efecto benéfico de la L-DOPA tiende a disminuir con el tiempo e incluso a empeorar presentándose un efecto colateral incapacitante que son las discinesias. Otra opción terapéutica es por medio de métodos quirúrgicos como la palidotomía y la estimulación cerebral profunda; estimulación tálamica, palidal y del nucleo subtalámico. De manera muy interesante también se han utilizado fármacos agonistas de los receptores D2-like como el Pramipexol y Ropirinol que interesantemente presentan una elevada afinidad por el receptor dopaminérgico D3 de nuestro interés en este trabajo.

1.1.1 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH)

El TDAH es un desorden multifactorial en el desarrollo conductual y cognitivo en el cual los principales síntomas son la falta de atención, la impulsividad y la hiperactividad (Terje, et al., 2005), es el trastorno neuropsiquiátrico más común presente en la etapa de desarrollo o edad infantil, afectando aproximadamente del 3 al 8% de niños en edad escolar, el cual a menudo continua hasta la edad adulta (Barkley, R.A. 1990). Las consecuencias a largo plazo para los niños que presentan TDAH incluyen bajo rendimiento educacional y vocacional así como un elevado riesgo de presentar desordenes antisociales así como tendencia a consumir drogas de abuso. (Mannuzza, S., et al., 1997). La etiología del TDAH es hasta la fecha desconocida y su diagnostico es exclusivamente clínico careciendo de algún tipo de marcador molecular y basándose principalmente en la historia conductual de los niños con TDAH así como de diversos estudios de neuroimagen como el EEG (electroencefalograma), el PET (tomografía de emisión de positrones), y la resonancia magnética funcional (fRMN), entre otros.

1.1.2 Etiología

La etiología del TDAH hasta la fecha es desconocida, sin embrago existen dos hipótesis muy aceptadas; la neurobiológica y la genética.

Hipótesis neurobiológica; En la década de los 80´s diversos investigadores por medio de estudios de neuroimagen identificaron anormalidades en el estriado (caudado-putamen) y globo pálido, estructuras que forman parte de los ganglios basales y a su vez proponen que existe un desequilibrio en o entre los sistemas dopaminérgicos que inervan dichos núcleos, posteriormente identifican también deficiencias en el lóbulo frontal y regiones subcorticales motoras, lo que trae como consecuencia una deficiente neurotransmisión entre la corteza cerebral y los ganglios basales a lo cual se le atribuye el desarrollo de los síntomas del TDAH (Alexander et al., 1986; Zametkin y Rapaport 1987; Cummings et al., 1993).

Hipótesis genética; Existen diversos estudios genéticos que apoyan una relación de diversos genes con la etiología del TDAH entre los cuales se encuentran el gen del transportador a dopamina *DAT1* situado en el cromosoma 5 (5p15.3), el gen del receptor *D2* (11q22-23), el gen del transportador de norepinefrina *NET1*, el gen del receptor *D1* y por último una variante alélica del gen del receptor D4 ($D_{4.7}$) situado en el cromosoma 11 (11p15.5), receptor al que enfocamos también parte de nuestro trabajo (Roman, et al., 2004; Faraone, et al., 2001)

1.1.3 Terapéutica

Los fármacos de primera elección para el tratamiento de este trastorno son los psicoestimulantes que tras ser administrados a niños con TDAH paradójicamente disminuyen su actividad locomotora (si son administrados a sujetos sanos se presenta un incremento en la actividad locomotora), además de que su mecanismo exacto de acción es aún desconocido. El fármaco más prescrito hasta la fecha es el Metilfenidato (MPD) o Ritalin©, el cual es un psicoestimulante que posee una estructura química muy similar a la dextroanfetamina, un isómero de la anfetamina (Kalivas, 1995; Teo et al., 2003; Solanto, et al., 1998). El mecanismo de acción del MPD es el bloqueo de transportador de dopamina en la membrana celular presináptica provocando un incremento en los niveles extracelulares de dopamina (Challman, et al., 2000; Hurd, Y.L. 1989).

2. DOPAMINA

La dopamina es la catecolamina con función neurotransmisora predominante en el cerebro de los mamíferos donde controla una variedad de funciones entre las cuales se encuentra la actividad locomotora, la cognición, las emociones, el reforzamiento, la ingesta de comida y la regulación endocrina. En la periferia la DA participa como modulador de la función cardiovascular, liberación de catecolaminas, secreción de hormonas, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale C., et al., 1998)

2.1 Síntesis de dopamina

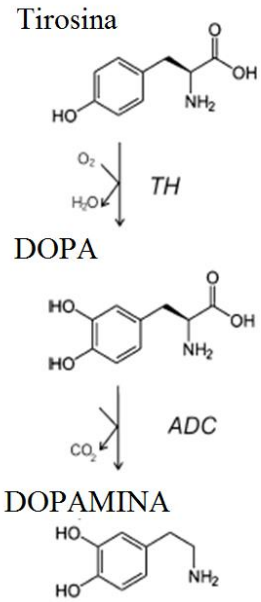

Figura 1. Síntesis de dopamina. Modificada de Rondou P. et al., 2010.

La dopamina es una catecolamina formada por un grupo catecol; benceno con dos hidroxilos (Fig.1) y una cadena de etilamina (Jackson, et al., 1994). Su síntesis se lleva a cabo en el citosol de terminales nerviosas donde se encuentran en elevada concentración las enzimas responsables; la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (ADC), una vez sintetizada la dopamina es transportada a vesículas para su almacenamiento a través de una bomba de protones dependiente de ATP, y puede ser degradada tanto en el citosol como en la terminal postsináptica por la monoaminooxidasa (MAO) y la Catecol – O- metiltransferasa (COMT), (Felman, et al., 1997). Una vez liberada la dopamina al espacio sináptico se une a sus distintos receptores tanto pre como postsinápticos y el factor que determina el fin de su efecto esta dado por su recaptura y/o degradación enzimática en las propias terminales que la liberaron. (Cooper, et al., 1996)

El sistema dopaminérgico ha sido profundamente investigado durante las últimas cuatro décadas por tener estrecha relación con diversas enfermedades neuropsiquiátricas, como las que previamente mostramos.

2.2 Receptores dopaminérgicos

Las acciones fisiológicas de la dopamina están mediadas por al menos 5 diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G (Fig.2), clasificados en familia D1-like (D1 y D5) y D2-like (D2, D3 y D4) Spano et al. (1978). Al principio fueron clasificados en base a su actividad estimulatoria o inhibitoria sobre la adenilato ciclasa (Kebabian & Calne, 1979), y posteriormente se diferenciaron claramente gracias a estudios farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos así como a su distribución anatómica.

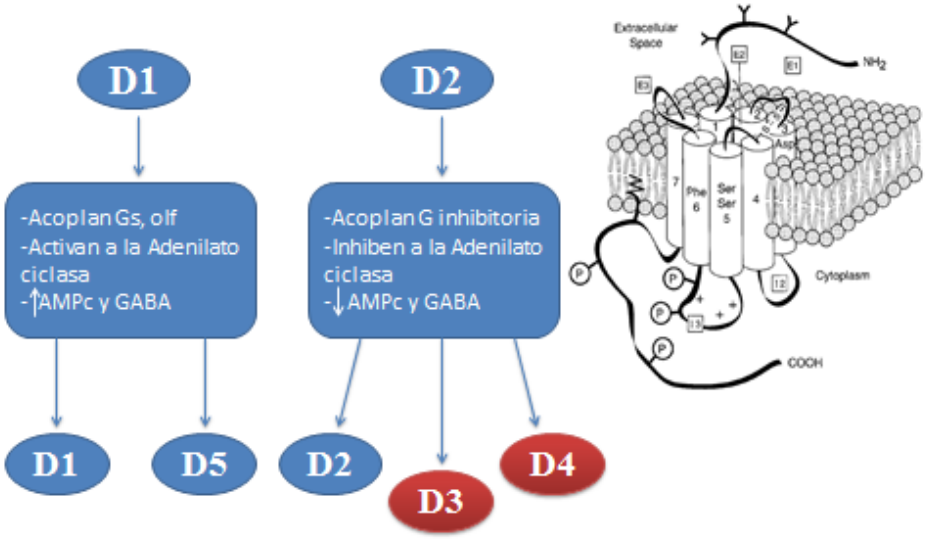

Figura 2 Estructura molecular y clasificación de los receptores dopaminérgicos. Modificada de Missale C. et al., 1998.

2.2.1 Receptor D1

El receptor D1 carece de secuencias intrónicas (opuesto a los D2-like "ver tabla 1") y solo un miembro adicional de la familia D1 ha sido clonado, denominado D5 para humanos y D1b para roedores (Grandy, et al., 1991; Sunahara, et al., 1991; Tiberi, et al., 1991) los cuales comparten una elevada homología (80%) con los dominios transmembranales del D1. El receptor D1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y se caracteriza por estimular a la adenilato ciclasa (AC) y aumentar la síntesis de AMPc por estar acoplado a proteínas G_s/G_o (Dearry, et al., 1990; Monsma, et al., 1990; Zhou, et al., 1990).

A su vez la activación de los RD1 modula los niveles de calcio a través de canales tipo L (Hernández-López et al., 1997; Surmeier, et al., 1995).

Se ha encontrado que la activación del receptor D1 aumenta la liberación de [^{3}H]-GABA en la SNr a través de la vía adenilil ciclasa→AMPc→PKA. El RD1 posee una afinidad por la dopamina de Ki (nM) = 2300 (Sokoloff, et al, 1992) y diversas funciones psicomotoras son ejercidas por la activación de los RD1 que junto con los RD2 se encargan de la mayoría de las conductas dependientes de dopamina, y presenta a su vez una amplia distribución en el cerebro.

Tabla 1. Caracteristicas moleculares de los receptores a dopamina

	D1-like		D2-like			
	D1	D5	D2L	D2S	D3	D4
Aminoácidos	446(r)	475(r)	415(r)	444(r)	446(r)	387-515(h)
	446(h)	477(h)	414(h)	443(h)	400 (h)	385(r)
Aminoácidos in su 3er asa	57(r)	50(r)	135(r)	444(r)	166(r)	101-61(h)*
intracelular	57(h)	50(h)	134(h)	443(h)	120(h)	106(r)
Aminoácidos in su COOH	113(r)	117(r)	16(r)		16(r)	18(r)
Terminal	113(h)	116(h)	16(h)		16(h)	18(h)
Introns	0	0	6		5	3
Localización cromosomal	5q35.1	4p15.1-16.1	11q22-23		3q13.3	11p15.5

r, rata; h, humano, *Número de a.a. en el receptor D4 humano depende del número de repeticiones en su tercera asa intracelular.

Tabla 1. Características moleculares de los receptores a dopamina. Modificada de Missale C. et al., 1998.

El receptor D1 generalmente se encuentra expresado en mayor densidad que los receptores D2. A nivel de los ganglios basales el RD1 se encuentra expresado presinápticamente en las neuronas GABAérgicas (que a su vez co-expresan sustancia P y dinorfina) proyectando hacia la SNr y globo pálido interno y formando sinapsis simétricas (Levey, et al., 1993).

Una de las funciones más estudiadas de la activación de los receptores dopaminérgicos es sobre la conducta motora, en este contexto se ha observado que la activación selectiva de los receptores D1 promueven un incremento sobre la actividad locomotora y este efecto se ve potenciado por la activación simultanea de los receptores D2. (Gershanik, O. et al., 1983; Jackson, D.M. et al., 1994). Este efecto farmacológico fue confirmado posteriormente por experimentos con ratones KO. El receptor D1 tiene una distribución regional similar en la rata, el mono y el humano.

2.2.2 Receptor D2

El RD2 fue el primer receptor caracterizado de la subfamilia D2-like y el primer receptor dopaminérgico clonado (Bunzow, et al., 1988). Comparte una homología del 75% y del 53% en sus dominios transmembranales con los RD3 y RD4 respectivamente (Civelli, O., et al., 1993; Gingrich, J. a.,et al., 1993; Jackson, D.M., et al., 1994; O'dowd, B.F., 1993). Dos isoformas del RD2 son generadas por splicing alternativo del mismo gen denominadas D2 (Short) y $D2_L$ (Long) que se diferencian en la inserción de un segmento de 29 aminoácidos en su tercera asa intracelular. Ambas isoformas muestran el mismo perfil farmacológico, ambas inhiben a la AC sin embargo el $D2_S$ muestra mayor afinidad por la AC, esto en sistemas de expresión heterólogos y proponen que los $D2_S$ y los $D2_L$ tienen distintas funciones fisiológicas *in vivo* pero es muy difícil extrapolar los resultados a receptores nativos en neuronas (Montmayeur, J. P., et al., 1991; Dal Toso, R. B., et al., 1989). El $D2_S$ es altamente expresado en cuerpos celulares dopaminérgicos y axones y es prevalente en el mesencéfalo e hipotálamo, mientras que el $D2_L$ que es predominantemente expresado a nivel postsináptico prevalece en CPu y NAc (Khan, et al., 1998; Tan, et al., 2002). Los RD2 están acoplados a proteínas Gi, inhiben a la AC, activan canales de K^+ (hiperpolarización celular), estimulan a la fosfolipasa A2, inhiben canales de Ca^{2+} tipo L, estimulan la PLC y al intercambiador Na^+/H^+, además de que poseen una afinidad por la dopamina con una de Ki (nM) = 2000. (Sokoloff, et al., 1992).

La distribución del RD2 en los ganglios basales ha sido extensamente estudiada por el papel de estos receptores en el control motor así como su implicación en la Enfermedad de Parkinson. Los RD2 tienen gradientes de distribución uniforme en el CPu con una elevada concentración de RD2 en la porción lateral del CPu mayor que en la porción medial (Joyce, et al., 1985; Fisher, et al., 1994). Análisis inmunohistoquimicos con anticuerpos específicos y de hibridación in situ muestran que el tanto la proteína como el RNAm del RD2 están localizados en cerca del 50% de neuronas de tamaño medio y en cerca del 80% de interneuronas colinérgicas estriatales (Bouthenet, et al., 1987; Le Moine, et al., 1990a) y están concentrados en dendritas y pericaria. En neuronas espinosas el RD2 se encuentra en las cabezas espinosas dentro de la neuropila más que a nivel del soma (Levey, et al., 1993; Fisher et al., 1994; Sesack, et al., 1994).

En densidades postsinápticas están presentes en sinapsis asimétricas estriatales, también se encontró inmunoreactividad en botones terminales formando mas sinapsis simétricas que asimétricas (Levey, et al., 1993; Hersch, et al., 1995; Wang, & Pickel, 2002), así como en terminales dopaminérgicas consistente con la hipótesis de autoreceptores D2, y en sitios perisinápticos (Yung, et al., 1995). En el sistema SN-CPu están estratégicamente localizados para satisfacer funciones de autoreceptor a nivel de las dendritas del mesencéfalo y de manera presináptica en axones terminales, también tienen funciones presinápticas en terminales no dopaminérgicas y acciones postsinápticas en las dendritas espinosas del CPu. También se ha evidenciado la segregación de los RD2 a las neuronas estriatales que co-expresan encefalina o "vía indirecta" (vía estriato-palido-nigral) y los RD1 a la "vía directa" co-expresando sustancia P y dinorfina (Gerfen, et al., 1990; Le Moine, et al., 1990b, 1991; Le Moine, & Bloch, 1995; Hersch, et al., 1995; Yung, et al., 1995; Maltais, et al., 2000). Sin embargo otros reportes proponen que todas las neuronas estriatales expresan ambos receptores D1 y D2 y que coexisten en proporciones variables (Ariano, et al., 1992; Surmeier, et al., 1992; Aizman, et al., 2000). En la sustancia nigra los receptores están localizados en la SNr ventral y en la SNc en la pericardia y dendritas (Levey, et al., 1993; Yung, et al., 1995). Lesiones en la vía nigroestriatal con 6-OHDA disminuyen los sitios "binding" en la SNc indicando que los autoreceptores D2 están presentes en la SNc (Morelli, et al., 1987, 1988; Filloux, et al., 1987a). El receptor D2 tiene una distribución regional similar en la rata, el mono y el humano.

2.2.3 Receptor D3

Fue el segundo receptor de la subfamilia D2-like en ser clonado (Sokoloff, et al., 1990), comparte una homología del 75% con el RD2 en sus dominios transmembranales y es el receptor dopaminérgico con mayor afinidad por la dopamina con una Ki = 30nM (Sokoloff, et al 1992).

Se han identificado hasta la fecha siete polimorfismos del RD3 los cuales son generados por medio de splicing alternativo (Fig. 3) los cuales son el $RD3_{L\ (long)}$, el $RD3_{S\ (short)}$ el cual carece de 21 aminoácidos en su tercer asa intracelular (son los únicos que ligan dopamina), el RD3nf o no funcional carece de los dominios 6 y 7 transmembranales lo cual le impide anclarse a la membrana y ligar dopamina y se cree que tiene una función moduladora sobre los otros receptores D3 secuestrándolos en el citosol, en cuanto a los otros polimorfismos del RD3 hasta la fecha no se han caracterizado; D3(TM3-del), D3(TM4-del), D3(O2-del) y el rD3in (Richtand N.M., 2006).

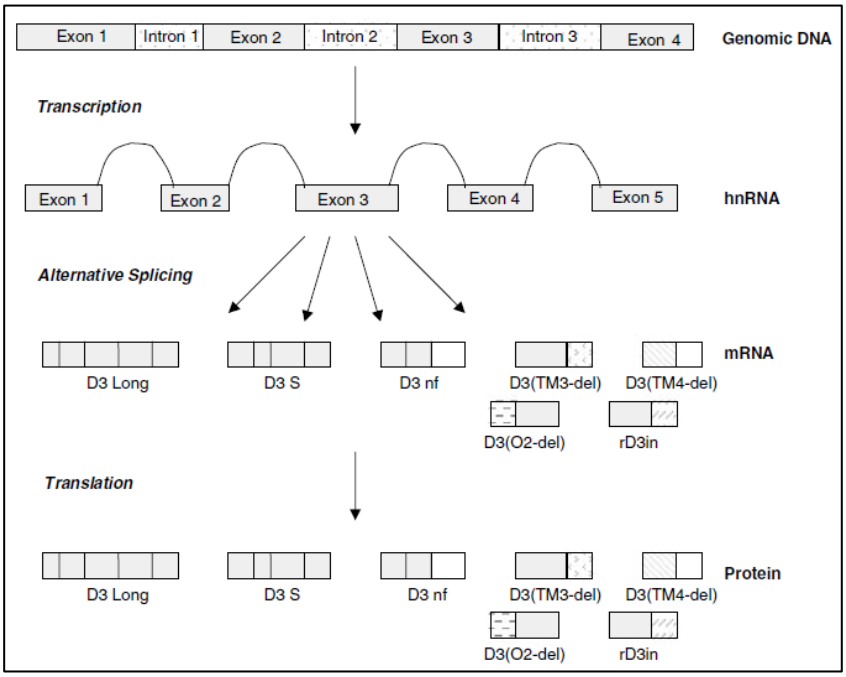

Figura 3 Polimorfismos del receptor D3. Se generan por medio de splicing alternativo, los polimorfismos mejor caracterizados hasta la fecha son el D3L, el D3S y el D3nf o no funcional. Tomada de Richtand N.M 2006.

Similar a los receptores D2 y D4 el receptor D3 se acopla a proteínas Gi, inhiben a la adenilato ciclasa, disminuyen la formación de AMPc e inhibe la liberación de GABA (Sokoloff & Schwartz., 2003). La expresión del receptor D3 en el cerebro es varias veces menor que el receptor D2, y presenta una elevada expresión en zonas límbicas como el NAc, tubérculo olfatorio e islas de calleja (Sokoloff, et al., 1990; Levesque, et al., 1992; Bouthenet, et al., 1991; Diaz, et al., 1995).

A nivel de los ganglios basales se ha encontrado una densidad media de receptores D3 en el estriado así como el RNAm (Bouthenet, et al., 1991; Surmeier, et al, 1996) mientras que a nivel de la SNr se ha evidenciado la presencia del receptor pero no del RNAm (Diaz, et al., 1995) lo cual habla de un transporte vesicular del estriado hacia las proyecciones en la SNr. También se ha visto la presencia del receptor D3 en la SNc y área ventral tegmental (VTA) por lo que se piensa que a este nivel actúan como autoreceptores.

2.2.4 Receptor D4

Fue clonado por Van Tol et al., en 1991 y muestra una homología del 41% y 39% con los receptores D2 y D3 respectivamente. Este receptor acopla proteínas G inhibitorias, inhiben a la adenilato ciclasa, disminuyen la formación de AMPc e inhiben la liberación de GABA y también activa canales rectificadores de potasio con lo cual participa en la hiperpolarización neuronal, muestra una afinidad por la dopamina de aproximadamente Ki=50nM. En cuanto a su distribución presenta elevada densidad en distintas regiones de la corteza cerebral; cingulata, prefrontal y piriforme, en el CPu, media densidad en GPe y SNr (Khan y col., 1998).

En el sistema límbico se encuentra una alta densidad de receptores D4 en el NAc e hipocampo (Defagot, et al., 1997).

Desde su clonación este receptor ha sido bastante estudiado por presentar una elevada afinidad por la clozapina un antipsicótico atípico utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia (Seeman, et al., 1993). Sin embargo su papel fisiológico hasta la fecha es poco entendido, existen algunos reportes de sensibilización conductual y estudios postmortem de pacientes esquizofrénicos sin lograr una caracterización adecuada.

A su vez se sabe que este receptor presenta un número considerable de polimorfismos que van desde el $D_{4.2}$ al $D_{4.11}$ (Rondou P., et al., 2010) y constan de un número variable de repeticiones en tándem que constan de 48 pares de bases o 16 aminoácidos generados dentro de la tercer asa intracelular por medio de splicing alternativo (Fig. 4), esta tercer asa intracelular es requerida para la interacción con proteínas G y señalización por segundos mensajeros por esta razón en el contexto del trastorno por déficit de atención con hiperactividad el $D_{4.7}$ tiene una estrecha relación con esta patología y se considera menos sensible a dopamina y menos eficiente en su vía de señalización por lo cual se especulan los efectos benéficos de los fármacos psicoestimulantes en el tratamiento contra el TDAH (Van Tol, et al., 1992; Asghari et al., 1995).

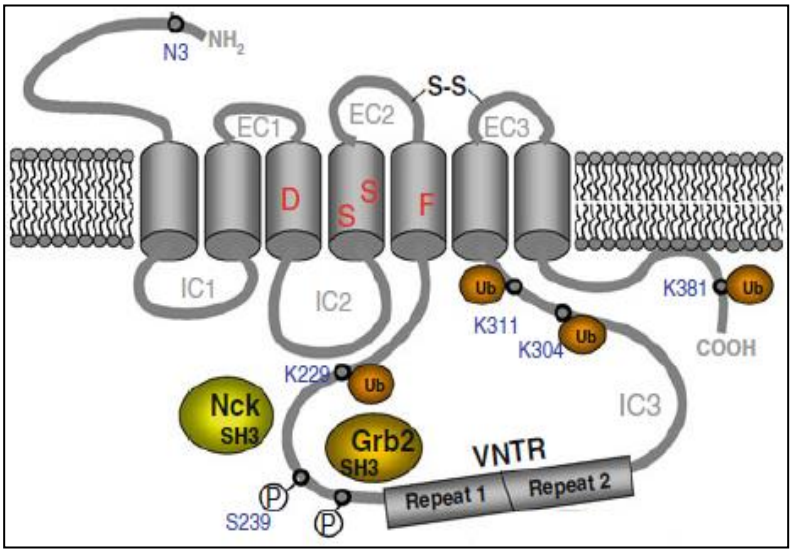

Figura 4. Polimorfismos del receptor D4. Generados por splicing alternativo, constan de un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) dentro de la tercera asa intracelular, van desde el $D_{4.2}$ al $D_{4.11.}$ Modificada de Rondou P. et al., 2010.

2.2.5 Receptor D5

Denominado RD_{1B} en roedores y RD5 en primates, su presencia en el sistema nervioso central se demostró en 1991 por Tiberi et al., y Sunahara et al., que mostraron la presencia de un receptor dopaminérgico similar tanto estructural como funcionalmente al receptor D1 teniendo una afinidad similar por los ligandos del receptor D1 (lo cual ha dificultado su caracterización) pero con una afinidad 10 veces mayor por la dopamina que el receptor D1. Su distribución a nivel de los ganglios basales es a nivel del CPu, SNr así como en la corteza frontal y parietal, sin embargo su localización exacta ha sido obstaculizada por la falta de ligandos con alta afinidad por el RD5 así como de anticuerpos específicos.

3. LOS GANGLIOS BASALES Y EL CONTROL MOTOR

3.1 Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son una serie de estructuras subcorticales que forman una red altamente organizada en donde existe una activación diferencial a distintos niveles dependiendo de funciones y circunstancias especificas. Dentro de la clasificación funcional de los ganglios basales se encuentran: El estriado (caudado-putamen), el globo palido en su región externa (GPe) e interna (GPi), el núcleo subtalámico (STN) y la sustancia nigra en su porción compacta (SNc) y reticulada (SNr). El sistema dopaminérgico proveniente de la SNc que a su vez inerva todas las estructuras que conforman los GB (Obeso, et al., 2008)

Estriado: Es el principal punto de entrada de información cortical, y consiste aproximadamente más del 90% de neuronas espinosas medianas (NEMs) que utilizan GABA como neurotransmisor (Perreault, et al., 2011). Aproximadamente el 5% de neuronas estriatales remanentes consiste en interneuronas no espinosas que expresan acetilcolina, somatostatina, GABA asociado a parvalbúmina o calretina (Gerfen & Surmeier 2011).

Globo Pálido Interno: Se considera el núcleo de salida de la información junto con la SNr y proyecta principalmente al tálamo motor, sus aferentes son de tipo GABAérgicas y glutamatérgicas y su balance determina la funcionalidad del núcleo.

Globo Pálido Externo: Sus neuronas utilizan GABA como neurotransmisor y a su vez proyecta hacia el nucleo subtalámico y la SNr (Rommelfanger & Wichmann., 2010). Sus aferentes son provenientes del estriado (GABAérgicas) y del nucleo subtalámico (Glutamatérgicas).

Sustancia Nigra Compacta: Sus neuronas utilizan dopamina como neurotransmisor y proyectan al estriado, al GPe y al núcleo subtalámico, estas neuronas son las encargadas de la inervación dopaminérgica de los ganglios basales.

Sustancia Nigra Reticulada: Sus neuronas son de naturaleza GABAérgica, presenta actividad espontanea, y proyecta al tálamo, colículo superior y nucleo pedunculopontino. Presenta aferentes glutamatérgicas del núcleo subtalámico, aferentes GABAérgicas provenientes del estriado y del GPe y aferentes dopaminérgicas provenientes de la SNc (Smith & Villalba., 2008).

Núcleo Subtalámico: Es de naturaleza glutamatérgica y presenta actividad autónoma, recibe inervación GABAérgica del GPe, glutamatérgica de la corteza sensorimotora y dopaminérgica de la SNc, a su vez manda proyecciones hacia la SNr, estriado, núcleo entopeduncular, SNc y corteza motora.

3.2 Organización funcional de los ganglios basales

Actualmente los GB están funcionalmente subdivididos en regiones dependiendo de la principal área de proyección cortical, en región motora, óculomotora, región asociativa, límbica y orbitofrontal (Alexander G. E., et al., 1986; Smith Y, et al., 1998).

Esta organización mantiene funciones como la atención, aprendizaje, conductas de recompensa, formación de hábitos, memoria de trabajo, emociones entre otros y dependen a su vez de la región cortical activada. (Pasupathy A, et al., 2005; Hikosaka O, et al., 2002; Seger CA, 2006). Esta compleja organización anatómico-funcional cambió la manera tradicional de ver a los GB como centros de procesamiento motor, sin embargo el papel de los GB en los desordenes del movimiento es el mejor definido y entendido.

3.3 Ganglios Basales y movimiento; vías estriatopalidales

En el circuito de organización funcional de los GB el estriado representa el núcleo de entrada de información proveniente de la corteza y la SNr/GPi los núcleos de salida de información hacia el tálamo. Las neuronas eferentes estriatales, neuronas espinosas medianas (NEMs) son de naturaleza GABAérgica y conectan con el GPe y el GPi por dos sistemas paralelos de proyección originados en distintas subpoblaciones estriatales denominados "vía directa" y "vía indirecta" (Fig.5)

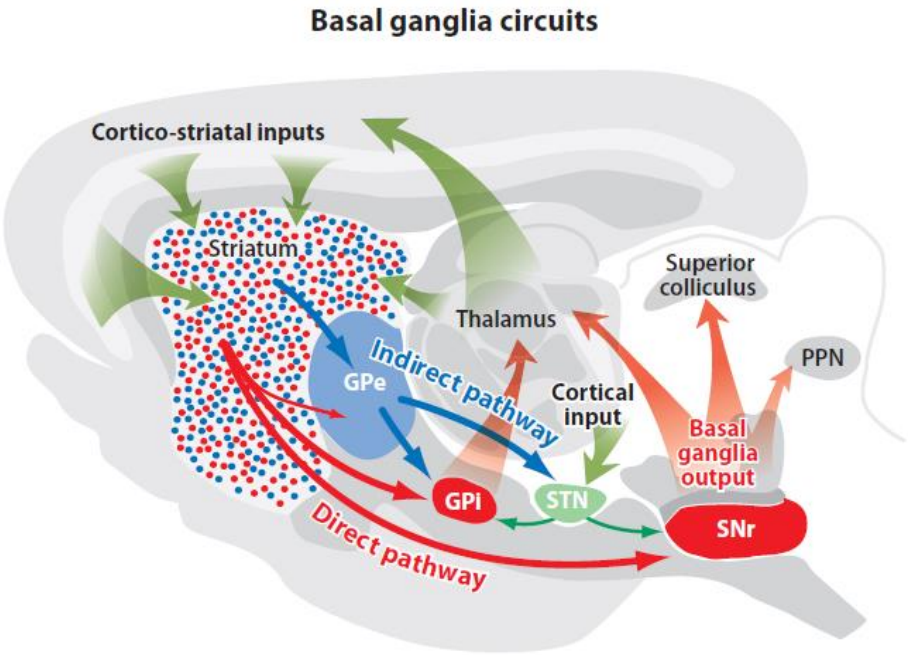

Figura 5. Circuitos de los ganglios basales. Tomada de Gerfen & Surmeier 2011.

Las neuronas de la "vía directa" proyectan directamente sobre el GPi/SNr, tienen expresión preferencial de receptores D1 y a su vez co-expresan los péptidos sustancia-P y dinorfina estableciendo una conexión inhibitoria monosináptica con las neuronas del GPi/SNr (Fig.5). Las neuronas de la "vía indirecta" expresan de manera preferencial receptores D2 y co-expresan encefalina, proyectan monosinápticamente desde el estriado hacia el GPe por una conexión inhibitoria e indirectamente a los núcleos de salida por medio de proyecciones GPe-STN-GPi.

Todas las neuronas del GPe, GPi, STN, y SNr son marcapasos autónomos, es decir generan potenciales de acción por su cuenta sin necesidad de establecer entradas sinápticas (Gerfen & Surmeier., 2011) en este mecanismo la dopamina tiene un papel imprescindible al modular los efectos de las entradas corticales glutamatérgicas por ejercer un efecto dual sobre las neuronas estriatales GABAérgicas excitando a las neuronas de la vía directa e inhibiendo a las neuronas de la vía indirecta modulando a las neuronas de los núcleos de salida (GPi/SNr) que proyectan hacia el tálamo y de esta manera controlar la generación de movimiento.

4. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS SOBRE EL CONTROL MOTOR (RATONES KNOCKOUT)

4.1 Knockout del receptor D1

El ratón RD1 -/- fue estudiado simultáneamente por dos grupos de trabajo (Drago, et al., 1994; Xu, et al., 1994a) en donde observaron un retardo en el crecimiento (sin ser posible explicarse por hipocalcemia, falla renal o una deficiencia en la hormona de crecimiento) y un aumento en la tasa de mortalidad en los ratones mutantes (después del destete, conducta relacionada con eventos reforzantes, los ratones no sentían la necesidad de beber ni alimentarse). En cuanto a la actividad locomotora Drago et al., no observaron diferencias entre RD1-/- y el ratón silvestre, evaluada en campo abierto, sin embargo los ratones KO presentaron menos eventos de rearing (considerado una conducta de exploración espontanea) que concuerdan con experimento farmacológicos en los cuales los eventos de rearing pueden ser modulados por agonistas (aumento) y antagonistas (disminución) de los RD1 (Hoffman & Beninger, 1985; Breese, et al., 1987; Dreher & Jackson,1989; Chandler, et al., 1990). Contrario a lo reportado por Drago et al., Xu et al., 1994 reportan una hiperactividad en los ratones KO del RD1 evaluada en cajas de actividad locomotora, y ambos grupos reportan un retraso en el aprendizaje y la memoria esto evaluado con la prueba del laberinto de agua de Morris. También evidencian la importancia del receptor D1 en el desarrollo de conductas relacionadas con el abuso de drogas como la autoadministración de cocaína y el proceso de sensibilización a anfetamina. Las diferencias fenotípicas entre ambos ratones KO puede deberse a la genética de fondo de los ratones y/o a la generación de los mismos.

4.2 Knockout del receptor D2

El RD2 fue el primer receptor dopaminérgico en clonarse por Bunzow et al., en 1988, el KO del RD2 fue hecho por Baik et al., en 1995 y observaron una pequeña disminución en el peso corporal de los ratones mutantes, también reducción su la tasa de fertilidad pero no en la de mortalidad, la conducta motora fue deteriorada, los RD2-/- muestran bradicinesia, anormalidades posturales y de marcha, evidencia de cataplexia, un comportamiento motor que se asemeja al tratamiento con antagonistas del RD2 (Jackson & Westlind-Danielsson., 1994).

La ausencia del RD2 no afecto la expresión de los otros receptores dopaminérgicos ni la de dinorfina pero si la de encefalina aumentándola un 40% (regulación independiente). También se evidencio la participación del RD2 en conductas de abuso de drogas (adicción y dependencia) con paradigmas de autoadministración de morfina y preferencia de lugar (Maldonado et al., 1997). Así como en autoadministración de etanol y alimento, y observaron que el RD2 es esencial para el desarrollo de estas conductas reforzantes.

4.3 Knockout del receptor D3

El desarrollo de un ratón KO del receptor D3 fue el mayor paso para entender su función in vivo debido a la falta de fármacos específicos para este receptor

El RD3 (-/-) muestra coordinación y reflejos normales, sin embargo este ratón presenta hiperactividad espontanea y elevada conducta exploratoria evaluada en campo abierto con elevada actividad locomotora y rearing (Accili, et al., 1996) conductas que son consistentes con estudios farmacológicos en los cuales por medio de un agonista del receptor D3 el 7-OH-DPAT observan una disminución en la actividad locomotora (Svensson, et al., 1994), y al usar un antagonista el U 99194 A observan un incremento de la actividad locomotora (Waters, et al., 1993) lo cual habla de un efecto inhibitorio del receptor D3 sobre la actividad locomotora.

4.4 Knockout del receptor D4

Este ratón KO del receptor D4 lo realizo Rubinstein et al., en 1997 y observaron una modesta y sostenida disminución en la locomoción y eventos de rearing tanto en ambientes novedosos como en familiares evaluada en campo abierto sin embargo y de manera paradójica en raton RD4(-/-) supero a los ratones silvestres en la prueba del rotarod, prueba que es diseñada para evaluar la coordinación motora compleja. A su vez estos ratones también mostraron sensibilidad locomotora a psicoestimulantes como cocaína, anfetamina y alcohol (Rubinstein, et al., en 1997), por lo anterior el papel fisiológico de este receptor dopaminérgico sobre la actividad locomotora es controversial.

4.5 Knockout del receptor D5

El knockout del receptor D5 fue el último en realizarse (Hollon, et al., 2002) y observaron una conducta y actividad locomotora normal evaluado tanto en cajas de actividad como en rotarod, laberinto de Morris, etc. Y similar al RD1(-/-) el RD5 (-/-) muestra reducida actividad locomotora inducida por cocaína confirmando que ambos receptores participan en esta respuesta (Elliot, et al., 2003).

Tabla 2. Resumen de los ratones knockout de los receptores dopaminergicos sobre la actividad locomotora y rearing (levantamientos)

Blanco	Frecuencia de levantamiento	Actividad Locomotora
Tirosin Hidroxilasa	Baja	Baja
DAT	Normal	Alta, solo en estimulos novedosos
D1	Baja	Normal
D2L+S	Baja	Baja
D3	Alta	Alta
D4	Normal	Baja
D5	Normal	Normal
D1+D3	Baja	Alta
D2+D3	Baja	Baja

Tabla 2. Resumen de los ratones knockout de los receptores dopaminérgicos sobre la actividad locomotora y "rearing". Modificada de Viggiano D. et al., 2003.

5. MODELO CLÁSICO DE ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES

Existe un modelo de organización funcional de los ganglios basales el cual se propuso a principios de los años 90´s y se mantiene vigente hasta la fecha (Fig. 6) en el cual se toma en cuenta la presencia de los receptores D1 y D2 los cuales tras al ser activados ejercen un efecto sinergista promoviendo la realización de movimientos voluntarios.

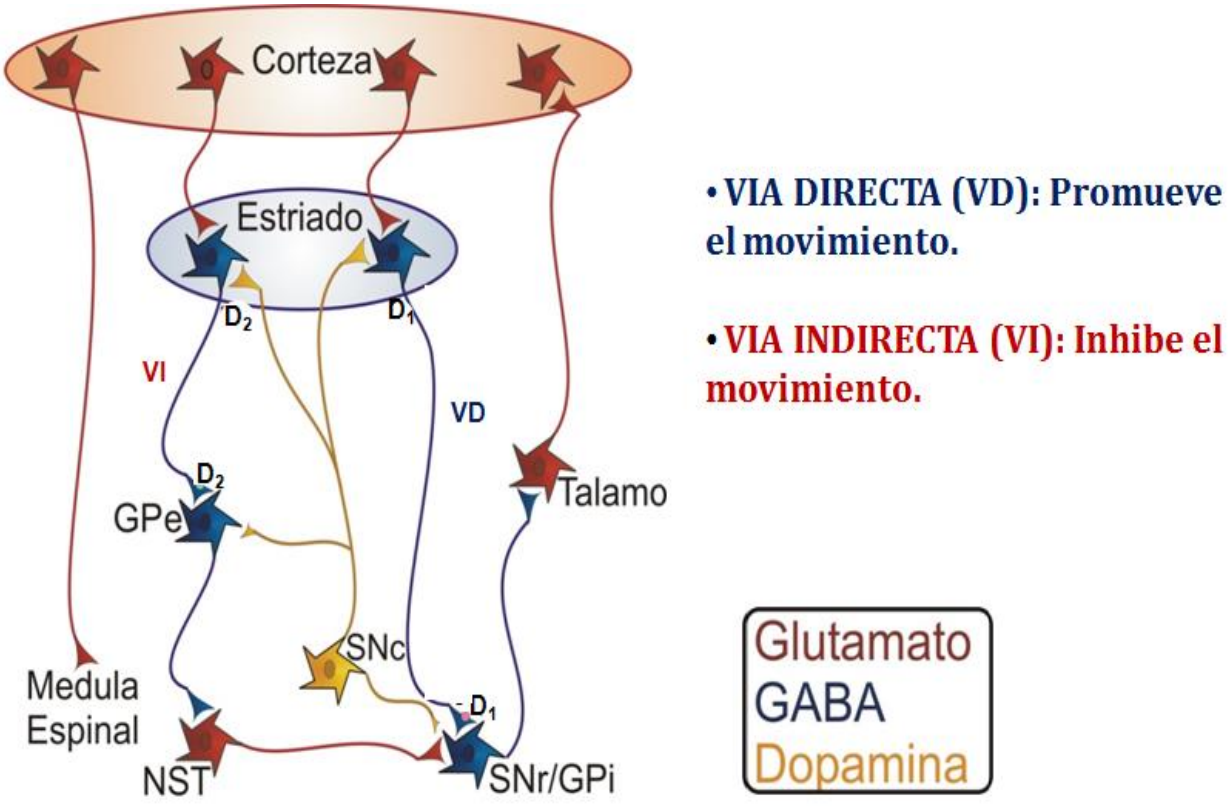

Figura 6. Modelo clásico de organización funcional de los ganglios basales.

5.1 Localización de receptores D3 en el circuito de los ganglios basales

Sin embargo este modelo clásico de organización funcional no toma en cuenta la presencia de los receptores D3 y D4 en los ganglios basales y existen diversos trabajos en donde evidencian su localización a distintos niveles, como los realizados por Surmeier en 1996 en donde muestran por medio de la técnica de PCR una expresión del RNAm del receptor D3 en el estriado de rata y a su vez hay una colocalización con el RNAm del receptor D1. (Fig. 7 a y b). Otro trabajo es el realizado por Diaz en 1995 en el cual por medio de la técnica de hibridación in situ evidencia la ausencia de RNAm del receptor D3 en la SNr, por lo cual se piensa que el receptor D3 es sintetizado a nivel del soma del estriado y por medio de transporte vesicular transportado hacia las terminales estriado-nigrales (Fig. 7 c).

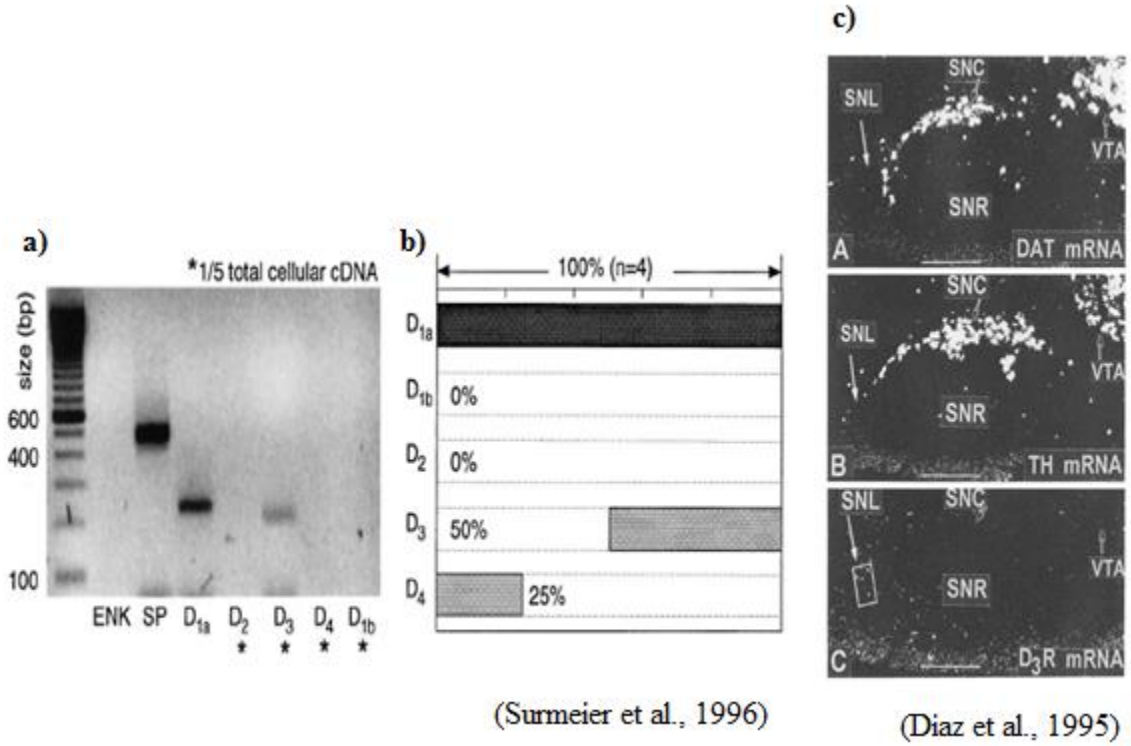

Figura 7 a) y b). RT-PCR en estriado de rata muestra la coexpresión del RNAm del receptor D1 y D3. En c) por medio de hibridación in situ evidencian la ausencia del RNAm del receptor D3 en las proyecciones estriadonigrales. Modificada de Surmeier et al., 1996 y de Díaz et al., 1995.

También existe una proyección del NAc hacia la SNr de naturaleza GABAérgica (Fig. 8), como en este núcleo hay una expresión predominante de receptores D3 es muy probable que en esta proyección se esté expresando este receptor D3. (Susan R, et al., 2010).

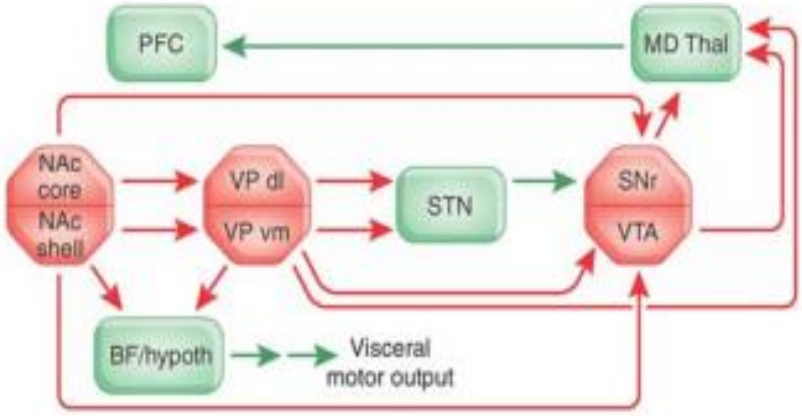

Figura 8. Esquema de la proyección GABAérgica del Núcleo Accumbens hacia la Sustancia Nigra reticulada. Tomada de Susan R,. et al., 2010.

5.2 Localización de los receptores D4 en el circuito de los ganglios basales

En cuanto al receptor D4 también existen trabajos donde muestra su localización en los ganglios basales como el realizado por Khan et al., en 1998 en donde por medio de una inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra el receptor D4 muestran su localización en distintos niveles (Fig. 9)

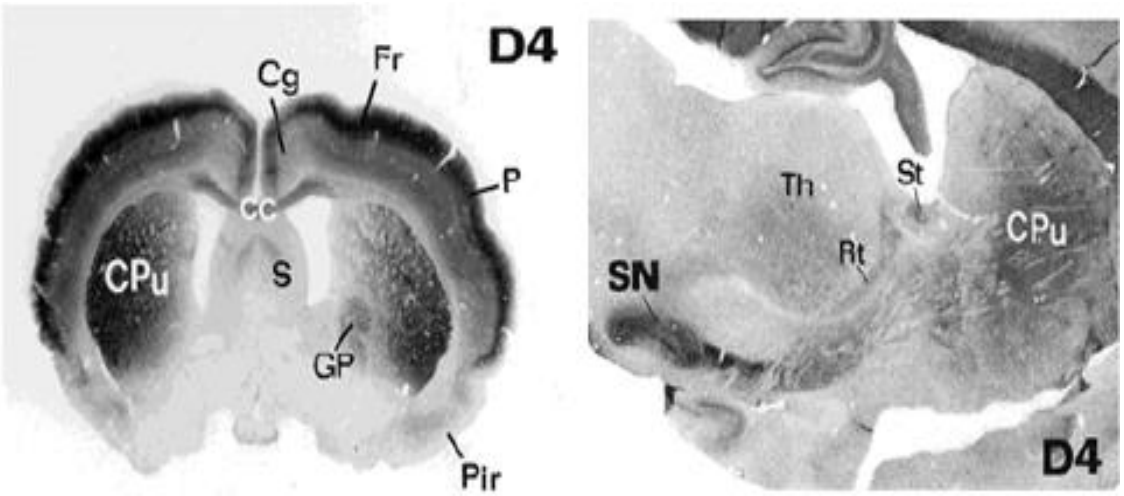

Figura 9. Inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra el receptor D4 en un corte coronal y sagital respectivamente. Muestra la localización y densidad del receptor D4 a distintos niveles de la corteza cerebral, el caudado-putamen, globo pálido y sustancia nigra. Modificada de Khan et al., 1998.

Por su parte los trabajos neuroquímicos y electrofisiológicos realizados por nuestro laboratorio, en donde por medio de la técnica de liberación de GABA radiactivo muestran que tras activar o antagonizar el receptor D4 con agonistas y antagonistas selectivos su función es la de inhibir la liberación de este neurotransmisor tanto a nivel de la SNr, el NST y el núcleo reticular del tálamo (Fig. 10).

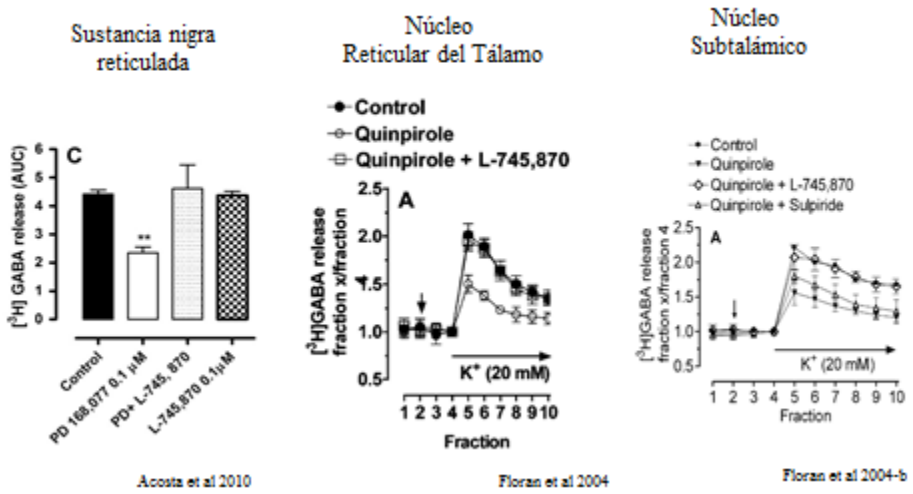

Figura 10. Graficas representativas de curvas de liberación de GABA marcado radioactivamente. Tras activar o antagonizar selectivamente al receptor D4 se observa una disminución en la liberación de [^{3}H]GABA a nivel de la sustancia nigra reticulada, el núcleo reticular del tálamo y el nucleo subtalámico. Tomada de Acosta et al., 2010; Floran et al.,2004 y Florán et al., 2004-b.

En cuanto a los estudios electrofisiológicos por medio de la técnica de medición de corrientes inhibitorias postsinápticas espontaneas se muestra que tras antagonizar selectivamente al receptor D4 hay in incremento en la frecuencia y no en la amplitud de estas corrientes lo cual habla de una localización presináptica evaluado en la SNr y en el Nucleo reticular del tálamo.

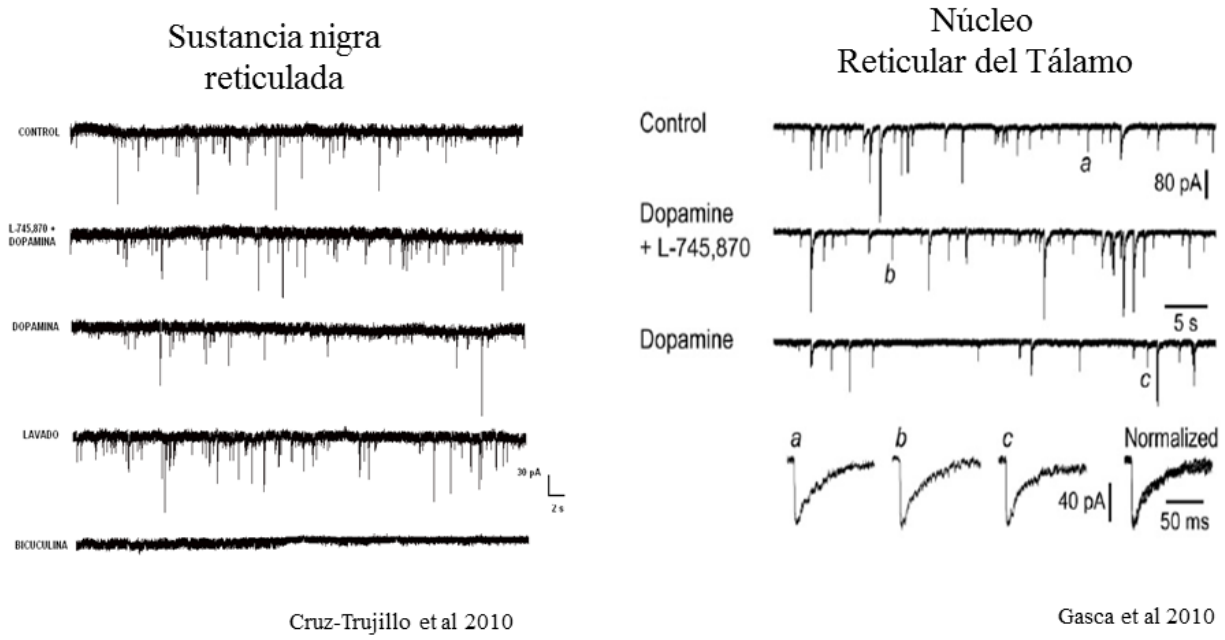

Figura 11. Trazos representativos de experimentos de registro de corrientes inhibitorias postsinápticas espontaneas. Se muestra que tras antagonizar al receptor D4 con su antagonista selectivo el L-745, 870 se produce un incremento en la frecuencia de estas corrientes inhibitorias postsinápticas espontaneas lo cual corresponde a una localización presináptica del receptor D4 de proyecciones provenientes del GPe hacia la sustacia nigra reticulada y nucleo reticular del tálamo. Tomado de Cruz- Trujillo et al., 2010; Gasca et al., 2010.

5.3 Circuito de los ganglios basales con la presencia de los receptores D1, D2, D3 y D4.

Por toda la evidencia mostrada, el modelo clásico de organización funcional de los ganglios basales puede complementarse con la localización de los receptores D3 y D4 a distintos niveles. (Fig. 12.) Tanto de la vía directa como de la indirecta, presentando una importante localización a nivel de los núcleos de salida, estructuras determinantes en el procesamiento de la información proveniente del circuito y decisivos para la ejecución o inhibición del movimiento.

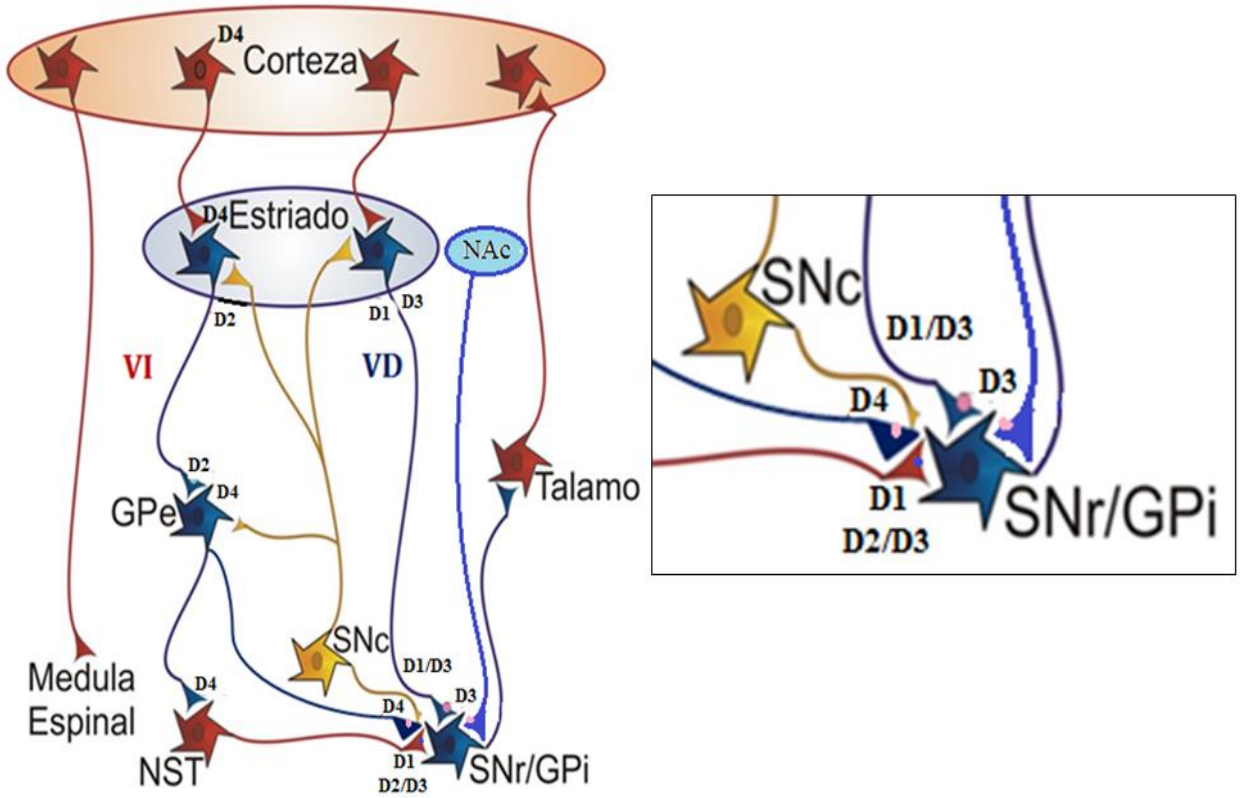

Figura 12. Circuito de los ganglios basales con la presencia de los receptores D1, D2, D3 y D4.

6. PAPEL FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES D3 Y D4 SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

Aunque se ha evidenciado la localización de los receptores D3 y D4 en el circuito de los ganglios basales, establecer su función fisiológica sobre la actividad locomotora ha sido bastante complejo y controversial.

6.1 Papel funcional del receptor D3

Como ya mencionamos anteriormente gracias al ratón KO y estudios farmacológicos activando o antagonizando al receptor D3 el papel de este receptor es inhibitorio sobre la actividad locomotora (Fig. 13 a y b)

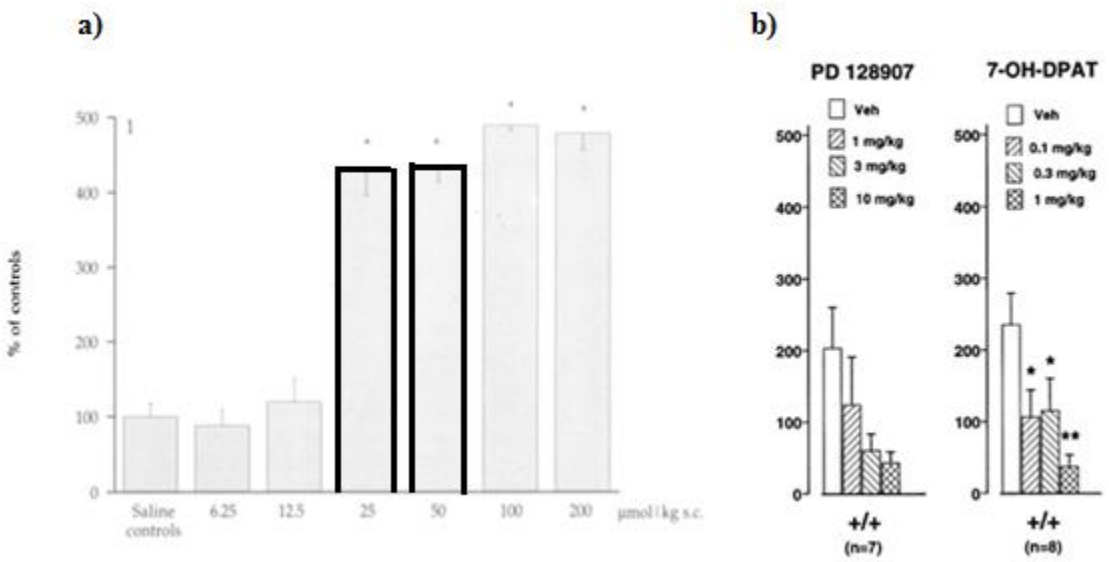

Figura 13 a). Incremento de la actividad locomotora de un grupo de ratas habituadas tras la administración i.p. del antagonista selectivo del receptor D3 el U-99194 A a dosis crecientes. En b) se observa la disminución de la actividad locomotora de grupos de ratones tras la administración i.p. a dosis crecientes de dos distintos agonistas del receptor D3 el PD 128907 y el 7-OH-DPAT. Modificada de N Waters et al., 1993; D. Boulay et al., 1999.

Sin embargo también existe un trabajo realizado por Marcellino en el 2008 en donde evidencian que el receptor D3 se encuentra formando un heterodímero con el receptor D1 en sistemas de expresión heterólogos e identifican la huella bioquímica de este heterodímero; la coactivación de ambos receptores D1 y D3 potencia los efectos estimulatorios del receptor D1 tanto en formación de AMPc, en liberación de GABA radiactivo (en terminales estriado-nigrales) así como a nivel conductual potenciando la actividad locomotora estimulada por la activación del receptor D1 en ratones reserpinizados además de corroborarlo con el ratón KO del receptor D3 (Fig. 14).

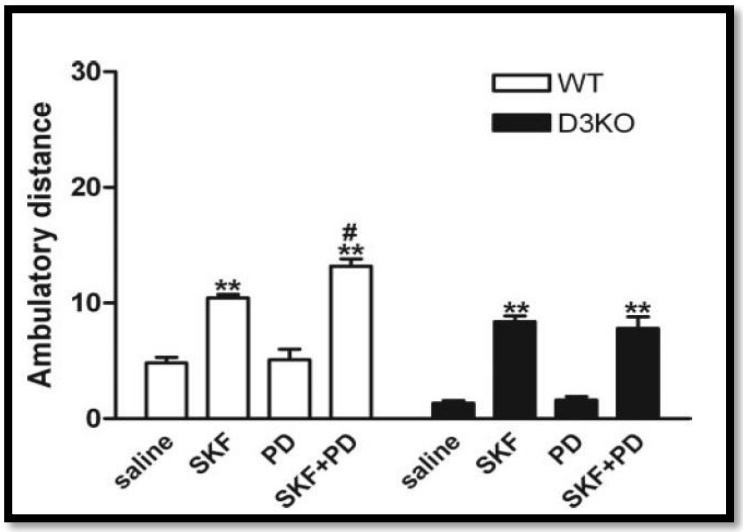

Figura. 14. Potenciación de la actividad locomotora de ratones reserpinizados "wild tipe" tras la coactivación de los receptores D1 y D3 con sus agonistas selectivos el SKF 38393 y el PD 128907 respectivamente así como en ratones knockout del receptor D3. Tomada de Marcellino et al., 2008.

Por lo anterior el papel del receptor D3 sobre la actividad locomotora es bastante controversial ya que por un lado se tiene a un receptor D3 inhibitorio y por otro lado a un receptor D3 que potencia los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1. Como podemos observar evalúan la actividad locomotora en distintos modelos animales, desde ratas habituadas, ratones, ratones KO y ratones reserpinizados, parte de nuestro trabajo es evaluar el papel del receptor D3 sobre la actividad locomotora con los mismos fármacos utilizados en nuestros antecedentes pero en un solo modelo animal, la rata Wistar y evidenciar su efecto sobre la conducta motora.

6.2 Papel funcional del receptor D4

El papel de este receptor dopaminérgico sobre la actividad locomotora es también muy controversial, Rubinstein en 2001 demuestra por medio de su ratón K.O. que el receptor D4 esta modulando la hiperexitabilidad cortical, a su vez también existe el trabajo realizado por Avale et al., en el 2004 en donde con ayuda del ratón K.O. del receptor D4 y con el modelo de ratones con déficit de atención con hiperactividad demuestran que el receptor D4 es esencial para el desarrollo de hiperactividad, con lo cual se podría pensar de un efecto inhibitorio del receptor D4 sobre la actividad locomotora, sin embargo cuando Erlij et al., en 2012 evaluaron el papel del receptor D4 sobre la actividad locomotora de las ratas con la administración I.P. de su agonista y antagonista selectivo, no observaron cambios en la actividad locomotora con respecto al grupo control (Fig. 15). Por lo cual el papel de este receptor es también bastante controversial, sin embargo nosotros pensamos que para poder evidenciar el papel de este receptor es necesario modificar el tono dopaminérgico.

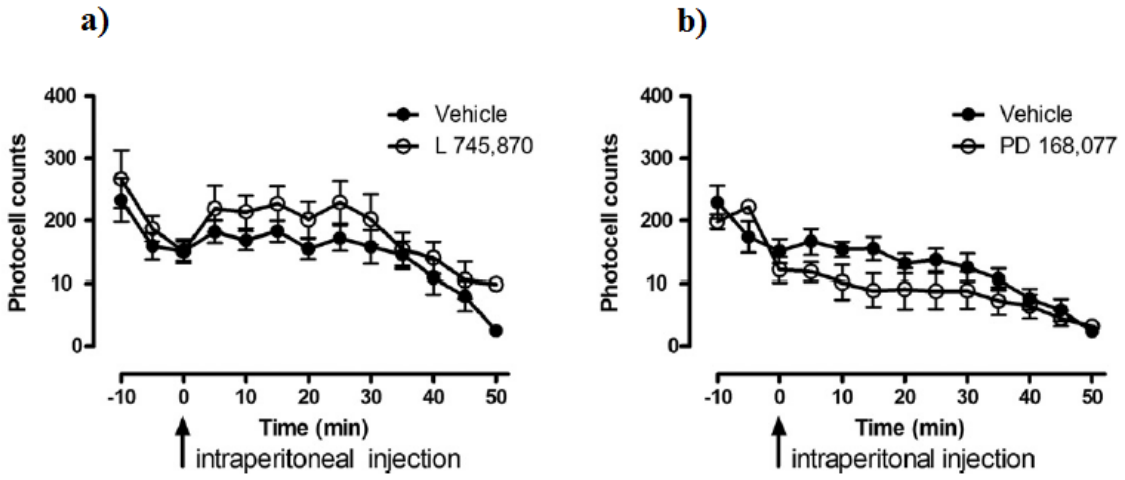

Figura 15. Actividad locomotora inducida por la activación o bloqueo selectivo del receptor D4 con su antagonista selectivo L-745,870 (0.1mg/kg i.p.) y su agonista selectivo el PD 168, 077 (1mg/kg i.p.) sin observarse cambios evidentes en la actividad locomotora. Modificada de Erlij et al., 2012.

7. JUSTIFICACIÓN

Debido a la estrecha relación de los receptores D3 y D4 en el desarrollo y/o sintomatología de diversos trastornos neuropsiquiátricos es de suma importancia conocer el papel de estos receptores sobre la actividad locomotora para comprender su posible influencia en dichas patologías.

8. HIPÓTESIS

Los receptores D3 y D4 conforman un sistema de inhibición paralelo sobre la activación de los receptores D1 y a su vez es posible modificar su función dependiendo del tono dopaminérgico del sistema.

9. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al entendimiento del papel de los receptores D3 y D4 en la actividad locomotora a través de su activación y bloqueo en condiciones en las que el tono dopaminérgico es modificado.

9.1 Objetivos específicos

-Evaluar el efecto del bloqueo selectivo de los receptores D1, D2, D3 y D4 sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina.

-Evaluar el antagonismo simultáneo de los receptores D1/D2, D1/D3 y D1/D4 así como sus combinaciones sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina.

-Evaluar el efecto de la activación indirecta de los receptores D3 y D4 sobre la actividad locomotora inducida por la activación selectiva del receptor D1.

-Evaluar el efecto de la activación selectiva de los receptores D1/D2, D1/D3 y D1/D4 en ratas previamente reserpinizadas.

10. MATERIAL Y METODOS

10.1 Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso corporal de 220 a 240 g con un régimen de agua y alimento *ad libitum*.

10.2 Fármacos

Se utilizaron los distintos agonistas y antagonistas selectivos de los receptores D1, D2, D3 y D4 (ver Tabla 3). Para incrementar el tono dopaminérgico utilizamos anfetamina y para depletarlo reserpina. Todos los fármacos se administraron vía intraperitoneal a las dosis indicadas en la tabla 3 (a excepción de la reserpina que fue subcutánea).

Tabla 3. Fármacos.

AGONISTAS	ANTAGONISTAS	INDIRECTOS
D1/ SKF 38393 2mg/kg 10mg/kg	D1/SCH 23390 0.1mg/kg	Anfetamina: Bloqueador DAT 1mg/kg
D2/ Sumarinole Pendiente	D2/ L-741,626 0.1mg/kg 0.5mg/kg	Reserpina: Bloqueador del VMAT2. 10mg/kg
D3/ PD 128,907 0.5mg/kg 7-OH-DPAT 0.25mg/kg	D3/ U99194A 20mg/kg	
D4/ PD 168,077 0.5mg/kg	D4/ L-745,870 0.1mg/kg	

Tabla 3. Fármacos utilizados.

10.3 Actividad locomotora

Para evaluar la actividad locomotora de las ratas se realizo en cajas diseñadas para tal fin (Fig. 16). Están hechas de acrílico, son oscuras, miden 22cm de ancho por 44cm de ancho y están acopladas a un sistema electrónico para monitorear la actividad locomotora de las ratas; el cual consta de 16 fotodiodos colocados a lo largo de la cajas de actividad, ocho fotodiodos de un lado y ocho del otro lado separados 5cm uno de otro e interconectados con haces de luz infrarrojo, por lo que cada vez que la rata interrumpa un haz de luz se registra como una cuenta de actividad motora general y cuando el animal interrumpe tres haces de luz infrarrojo se registra como desplazamiento horizontal (10 cm recorridos), esos datos se procesan en un programa computacional y así es como obtenemos los registros de actividad locomotora.

Figura 16. Cajas de actividad locomotora.

10.4 Metodología

La estrategia experimental se dividió en dos partes una en donde incrementamos el tono dopaminérgico con anfetamina y otra en donde depletamos el tono dopaminérgico con reserpina. Las ratas con tono dopaminérgico incrementado se expusieron previamente tres días a las cajas de actividad locomotora y al cuarto día se realizo la prueba.

10.4.1 Tono dopaminérgico incrementado con anfetamina

La metodología a seguir fue la siguiente, al inicio del experimento se le administro vía i.p. a distintos grupos de ratas los antagonistas selectivos de los receptores D1, D2, D3 y D4 a las dosis descritas en la Tabla 3. y se introdujeron en las cajas de actividad, 10 minutos después se les realizo una administración i.p. de anfetamina y se les evaluó la actividad locomotora durante 50 minutos dicho periodo fue el que se tomo en cuenta para nuestros resultados, donde los dos fármacos están produciendo sus efectos.

Otro estrategia que utilizamos en donde incrementamos el tono dopaminérgico pero de manera selectiva fue la siguiente; a un grupo de ratas al inicio del experimento se les administro una dosis alta del agonista selectivo del receptor D1 (SKF 38393 a 10mg/kg i.p.) y se les evaluó la actividad locomotora durante 50 minutos (control) a otro grupo de ratas les administramos la misma dosis alta del agonista del receptor D1 se introdujeron a las cajas de actividad y 10 minutos después les administramos 1mg/kg i.p. de anfetamina y se les evaluó la actividad locomotora durante 50 minutos, periodo de tiempo que tomamos en cuenta para nuestros resultados.

10.4.2 Tono dopaminérgico depletado con reserpina

En esta parte la metodología a seguir fue la siguiente; a ratas previamente reserpinizadas (17hrs antes de realizarse la prueba) se les evaluó la actividad locomotora (grupo control) y a distintos grupos de ratas reserpinizadas se les administro al inicio del experimento el agonista del receptor D1 (SKF 38393 2mg/kg i.p.) se introdujeron a las cajas de actividad y 10 minutos después se les realizó la administración del agonista del receptor a evaluar ya sea agonista D2, D3 y D4 según las dosis de la Tabla 3, y se evaluó la actividad locomotora durante 50 minutos, periodo de tiempo que se tomo en cuenta para nuestros resultados. Utilizamos los agonistas selectivos de los distintos receptores dopaminérgicos para poder evidenciar su efecto ya que el tono dopaminérgico fue depletado con reserpina.

11. RESULTADOS

11.1 TONO DOPAMINÉRGICO INCREMENTADO CON ANFETAMINA

11.1.1 Efecto del antagonismo de los receptores D1, D2, D3 y D4 sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina.

En estos experimentos se estudio la participación de los diferentes receptores dopaminérgicos en la respuesta a anfetamina. Como era de esperarse la administración de anfetamina (1 mg/kg) estimula la actividad locomotora por encima del basal (Fig. 17). El bloqueo del receptor D1 con su antagonista selectivo el SCH 23390 (0.1mg/kg), previno todo efecto estimulatorio de la actividad locomotora evocada por la anfetamina, llevándola a niveles similares al basal, en tanto que el bloqueo del receptor D2 no modificó la respuesta a anfetamina. Interesantemente el bloqueo de los receptores D3 y D4 con U-99194 A (20mg/kg) y L-745,870 (0.1mg/kg) respectivamente, potenciaron los efectos de la anfetamina (Fig 17).

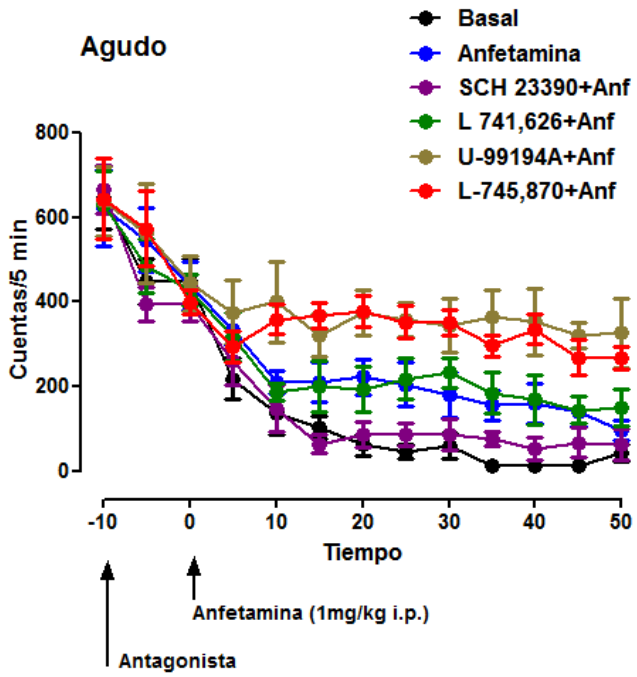

Figura 17. Curso temporal de la actividad locomotora inducida por anfetamina (1mg/kg i.p.) con la previa administración (10 minutos antes) de los distintos antagonistas dopaminérgicos. La grafica de círculos negros muestra la actividad locomotora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10); la grafica de círculos azules es la actividad locomotora estimulada por anfetamina a 1mg/kg (2304±197 cuentas/50min, n=13); la grafica de círculos morados es la actividad locomotora estimulada por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D1el SCH23390 a 0.1mg/kg (1324±270cuentas/50min n=9); la grafica de círculos verdes es en presencia del antagonista del receptor D2 el 741626 a 0.5mg/kg (2454±216 cuentas/50min n=12); la grafica de círculos verde olivo es en presencia del antagonista del receptor D3el U-99194 A a 20mg/kg (3838±465 cuentas/min, n=8) y la grafica de círculos rojos es en presencia del antagonista del receptor D4 el L-745,870 a 0.1mg/kg (3863±194 cuentas/50min, n=14).

Tal como se ve en el curso temporal la representación grafica de las cuentas totales de actividad motora inducida por anfetamina en presencia de los distintos antagonistas dopaminérgicos muestra resultados similares, pero mas fáciles de ver (Fig 18). El bloqueo del receptor D1 con su antagonista selectivo el SCH 23390 (0.1mg/kg), previno el efecto estimulatorio de la actividad motora evocado por la anfetamina (basal 1093±120 cuentas/50 min, Anfetamina 2304±197 cuentas/50min, Anfetamina+SCH23390 1324±270, Anf vs basal **p<0.001 Basal vs SCH23390+Anf ns. Anova seguida una prueba de comparación de Tukey n= 7-14 animales), llevándola a niveles similares al basal, el bloqueo del receptor D2 no interviene en la respuesta a anfetamina mientras que el bloqueo de los receptores D3 y D4 con U-99194 A y L-745,870 respectivamente, potenciaron los efectos de la anfetamina (3838±465 cuentas/min para el RD3) y (3863±194 cuentas/50min para el RD4). Anf vs U-99194 A ***p<0.0001 y Anf vs L-745,870 ***p<0.0001 n=8-14. Anova seguida de una prueba de comparación de múltiple de Tukey.

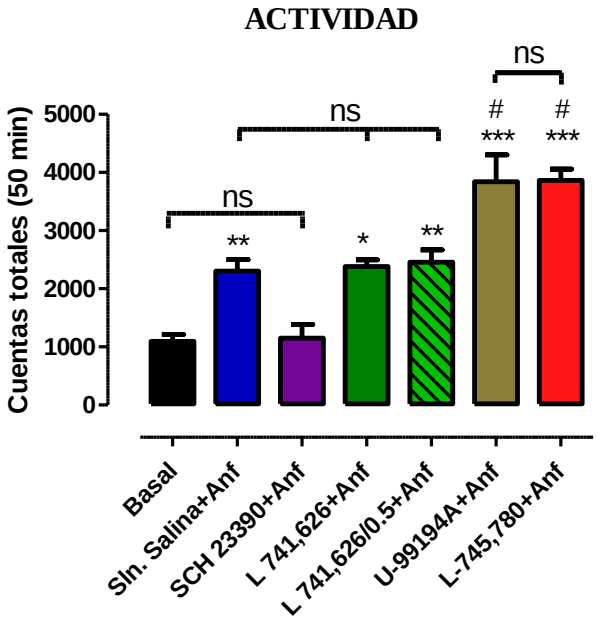

Figura 18. Representación grafica de las cuentas totales de la conducta motora inducida por anfetamina en presencia de los distintos antagonistas dopaminérgicos. La barra negra representa la actividad motora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10); la barra azul es la actividad motora inducida por 1mg/kg i.p de anfetamina (2304±197 cuentas/50min, n=13); la barra morada es la actividad motora en presencia del antagonista del receptor D1 el SCH 23390 a 0.1mg/kg (1324±270cuentas/50min n=9); las barras verdes muestran la actividad motora en presencia del antagonista del receptor D2 el L 741 626 a dos distintas dosis 0.1 y 0.5 mg/kg respectivamente (2381±117cuentas/50min, n=7 y 2454±216 cuentas/50min n=12); la barra verde olivo representa la actividad motora en presencia del antagonista del receptor D3 el U-99194 A a 20mg/kg i.p. (3838±465 cuentas/min, n=8) y la barra roja representa la actividad motora en presencia del antagonista del receptor D4 el L-745, 870 a 0.1mg/kg i.p. (3863±194 cuentas/50min, n=14). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01, **p<0.001 y ***p<0.0001. Los # representan las comparaciones entre la condición U-99194 A+Anf V.S. sln. Salina+Anf (***p<0.0001), U-99194 A+Anf V.S. L 741626 (**p<0.001 para ambas dosis) y L-745,870+Anf V.S. sln. Salina+Anf (***p<0.0001), L-745,870+Anf V.S. L 741 626 (**p<0.001 para la dosis de 0.1mg/kg y ***p<0.0001 para la dosis de 0.5mg/kg). ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

La representación grafica de las cuentas totales del desplazamiento horizontal inducido por anfetamina en presencia de los distintos antagonistas dopaminérgicos también es similar a la actividad locomotora en general (Fig 19). La respuesta en el desplazamiento horizontal no se ve modificada, (razón por la cual en adelante solo mostraremos la actividad locomotora general) el bloqueo del receptor D1 con su antagonista selectivo el SCH 23390, previno el efecto estimulatorio de la actividad locomotora evocado por la anfetamina, llevándola a niveles similares al basal, el bloqueo del receptor D2 no interviene en la respuesta a anfetamina mientras que el bloqueo de los receptores D3 y D4 con U-99194 A y L-745,870 respectivamente, potenciaron los efectos de la anfetamina (basal 1420±283 cuentas/50min, Anfetamina 3783±600 cuentas/50min, SCH23390+Anf 1463±318 cuentas/50min, U-99194 A+Anf 8315±2105 cuentas/50min y el L-745,870+Anf 7657±1167 cuentas/50min. Basal vs Anf **p<0.01, Basal vs SCH23390+Anf ns, Anf vs U-99194 A *** p<0.0001 y Anf vs L-745,870+Anf *** p<0.0001 n=7-14 animales). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey

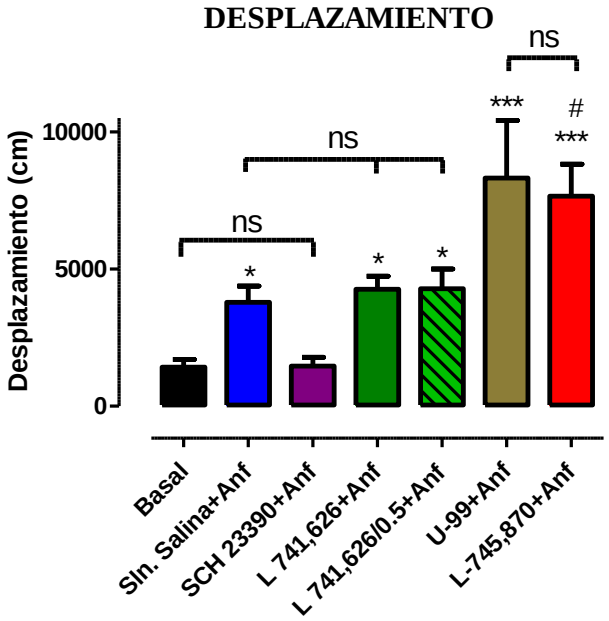

Figura 19. Representación grafica del desplazamiento horizontal inducido por anfetamina en presencia de los distintos antagonistas dopaminérgicos. La barra negra representa el desplazamiento horizontal de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1420±283 cuentas/50min, n=10); la barra azul representa el desplazamiento horizontal inducido por 1mg/kg i.p de anfetamina (3783±600 cuentas/50min, n=13); la barra morada muestra el desplazamiento en presencia de 0.1 mg/kg del antagonista del receptor D1 el SCH 23390 (1463±318 cuentas/50min, n=9); las barras verdes muestran el desplazamiento horizontal inducido por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D2 el L 741 626 a dos distintas dosis 0.1 y 0.5 mg/kg respectivamente (4267±472 cuentas/50min, n=7 y 4287±713 cuentas/50min, n=12); la barra verde olivo representa el desplazamiento horizontal en presencia del antagonista del receptor D3 el U-99194 A a 20mg/kg i.p. (8315±2105 cuentas/50min, n=8) y la barra roja representa el desplazamiento horizontal inducido por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D4 el L-745, 870 a 0.1mg/kg i.p. (7657±1167 cuentas/50min, n=14). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01, **p<0.001 y ***p<0.0001. El # representa la comparación entre la condición con L-745,870+Anf V.S. Sln. Salina+Anf (*p<0.01), L-745,870+Anf V.S. L741 626 (*p<0.01 para ambas dosis). ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

11.1.2 Interacciones de los receptores D1/D3, D1/D4 y D2/D4 sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina.

Como pudimos observar en las figuras 17, 18 y 19 los receptores D3 y D4 están ejerciendo un efecto inhibidor sobre la activación del receptor D1 y a su vez la activación del receptor D1 es esencial para que se produzcan los efectos estimulatorios de la anfetamina ya que si se bloquea con el SCH 23390 los niveles de actividad regresan al basal. Por ello se estudio cual es la relación entre el bloqueo de los receptores D3 y D4 con los receptores D1. El receptor D3 ejerce un efecto modulador sobre la activación del receptor D1 (figura 20) ya que cuando se coadministran sus antagonistas, el U-99194 A (20mg/kg) y el SCH 23390 (0.1mg/kg) respectivamente solo es posible observar el efecto del bloqueo del receptor D1. (basal 1093±120 cuentas/50min, Anf 2304±197 cuentas/50min, U-99194 A+ Anf 4520±573 cuentas/50min, SCH23390/U-99194 A + Anf 1518±198cuentas/50min. Basal vs Anf *p<0.01, Anf vs U-99194 A+Anf ***p<0.0001 y Basal vs SCH23390/U-99194 A+Anf ns. n=5-13). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

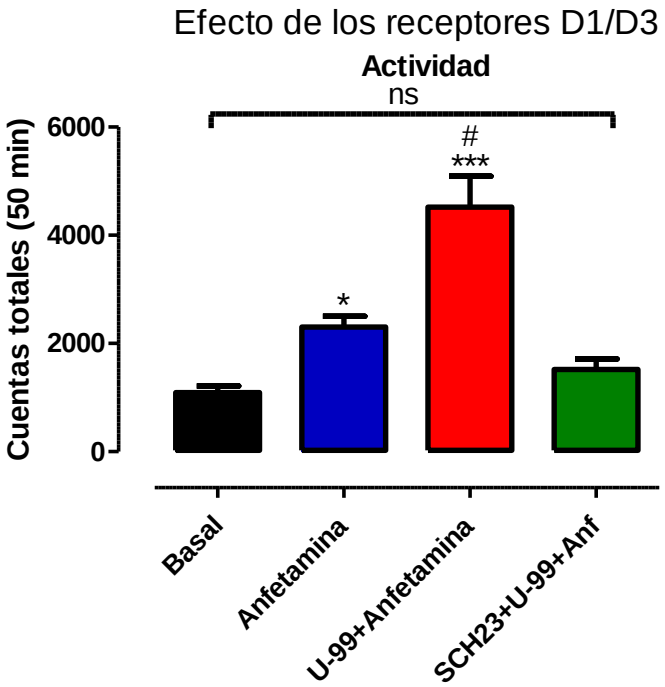

Figura 20. Representación grafica de las cuentas totales de la actividad locomotora inducida por antagonismo simultaneo de los receptores D1 y D3. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10); la barra azul es la actividad locomotora inducida por anfetamina (2304±197 cuentas/50min, n=13); la barra roja representa la actividad locomotora estimulada por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D3 el U-99194 A a 20mg/kg i.p. (4520±573cuentas/50min, n=8); la barra verde es la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia los antagonistas de los receptores D1 y D3 el SCH 23390 y el U-99194 A a 0.1 y 20mg/kg respectivamente (1518±198cuentas/50min, n=5). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01, **p<0.001. El # de ***p<0.0001 entre el grupo U-99194 A+Anfetamina V.S. Anfetamina. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

De igual manera evaluamos la modulación que el receptor D4 ejerce sobre la activación de los receptores D1. Como podemos observar en la figura 21 el receptor D4 ejerce un efecto modulador sobre la activación del receptor D1 ya que cuando se coadministran sus antagonistas, el L-745,870 (0.1mg/kg) y el SCH 23390 (0.1mg/kg) respectivamente + anfetamina (1mg/kg) solo es posible observar el efecto del bloqueo del receptor D1 (Basal1093±120 cuentas/50min, Anf 2304±197 cuentas/50min, L-745,870+Anf 3863±194 cuentas/50min y SCH23390/L-745,870+Anf 1173±124 cuentas/50min. Basal vs Anf ***p<0.0001, Basal vs L-745,870 ***p<0.0001 y Basal vs SCH23390/L-745,870+Anf ns. n=9-14 animales). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

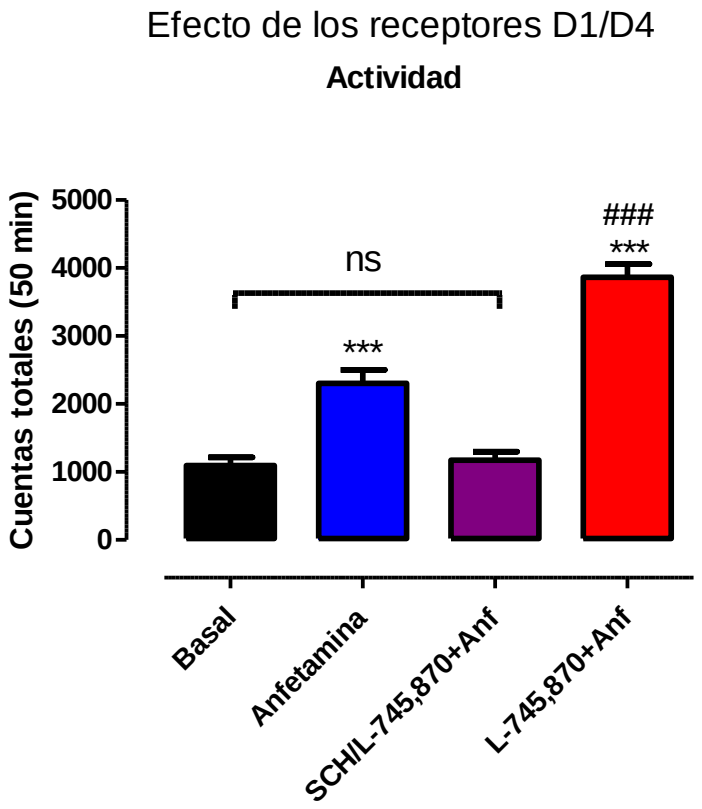

Figura 21. Representación grafica de las cuentas totales de la actividad locomotora inducida por antagonismo simultaneo de los receptores D1 y D4. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10); la barra azul es la actividad locomotora inducida por anfetamina (2304±197 cuentas/50min, n=13); la barra morada representa la actividad locomotora estimulada por anfetamina en presencia de los antagonistas de los receptores D1 y D4 (SCH 23390 y L-745,870 ambos a dosis de 0.1mg/kg i.p. 1173±124 cuentas/50min n=9); la barra roja es la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia únicamente del antagonista del receptor D4 (L-745,870 a 0.1mg/kg i.p. 3863±194 cuentas/50min, n=14). Los asteriscos y ### representan una diferencia significativa de ***p<0.0001. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Como observamos en las figuras 17, 18 y 19 el receptor D2 no participa en la respuesta locomotora inducida por anfetamina ya que cuando se bloquea con su antagonista el L741 626 a dos distintas dosis (0.1 y 0.5mg/kg i.p.) no se producen cambios significativos de actividad locomotora con respecto a la administración de anfetamina (1mg/kg). Ahora a su vez evaluamos si el receptor D4 ejerce un efecto inhibitorio sobre la activación del receptor D2 y como podemos observar en la figura 22 el receptor D4 no ejerce ningún efecto sobre la activación del receptor D2 (Basal 1093±120 cuentas/50min, Anf 2304±197 cuentas/50min, L 741 626 a dos distintas dosis 0.1 y 0.5 mg/kg respectivamente 2381±117cuentas/50min y 2454±216 cuentas/50min y L-745,870/L 741626+ Anf 3868±457 cuentas/50min. Basal vs Anf **p<0.001, Anf vs L741626+Anf ns y L741626+Anf vs L-745,870/L741626+Anf ***p<0.0001 n=7-13 animales). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

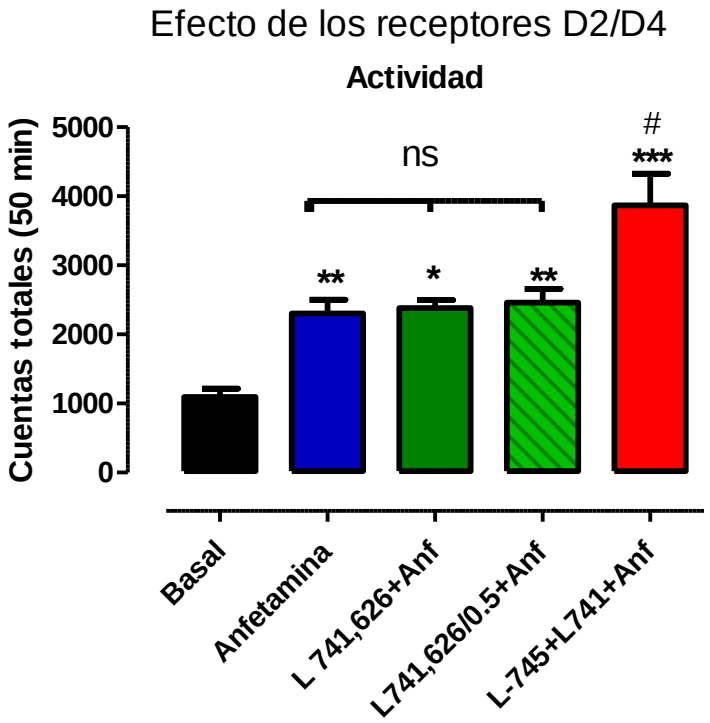

Figura 22. Representación grafica de las cuentas totales de la actividad locomotora inducida por antagonismo simultaneo de los receptores D2 y D4. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10); la barra azul es la actividad locomotora inducida por anfetamina (2304±197 cuentas/50min, n=13); las barras verdes muestran la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D2 el L 741 626 a dos distintas dosis 0.1 y 0.5 mg/kg respectivamente (2381±117cuentas/50min, n=7 y 2454±216 cuentas/50min n=12); y la barra roja representa la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia de los antagonistas de los receptores D2 y D4 a 0.5 y 0.1 mg/kg respectivamente (3868±457 cuentas/50min, n=9). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01, **p<0.001 y ***p<0.0001. El # representa una diferencia significativa de **p<0.001 entre los grupos L-745,870/L741 626+Anfetamina V.S. Anfetamina, y el L 741 626 +Anfetamina a ambas dosis. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

En la siguiente figura 23 se muestra como los receptores D3 y D4 ejercen un sistema de inhibición paralelo sobre los efectos estimulatorios de la activación de los receptores D1, ya que cuando se antagonizan con el U-99194 A (20mg/kg) y el L-745,870 (0.1mg/kg) en presencia de anfetamina (1mg/kg) se potencian los efectos motores inducidos por la anfetamina y cuando se coadministran los dos antagonistas de los receptores D3 y D4 los efectos potenciadores del antagonismo individual se ven sumados en un solo efecto inhibidor (Basal 1093±120 cuentas/50min, Anf 2304±197 cuentas/50min, L-745,870+Anf 3863±194 cuentas/50min, U-99194 A+Anf 3838±465 cuentas/min y U-99194 A/L-745,870+Anf 9857±1490 cuentas/50min. Basal vs Anf **p<0.001, Anf vs L-745,870+Anf **p<0.001, Anf vs U-99194 A+Anf *p<0.01, L-745,870+Anf vs L-745870/U-99194 A+Anf ***p<0.0001 y U-99194 A+Anf vs L-745870/U-99194 A+Anf ***p<0.0001 n=4-13 animales). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

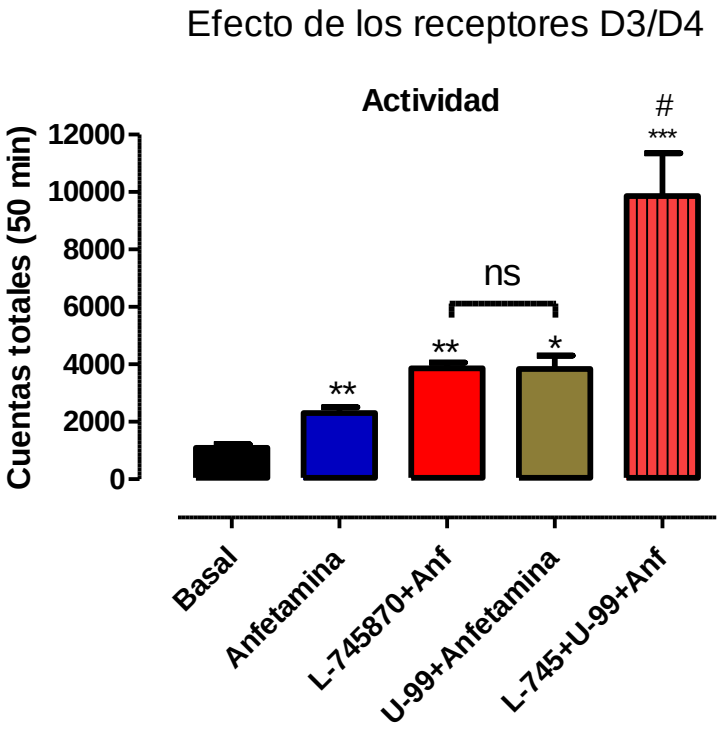

Figura 23. Representación grafica de las cuentas totales de la actividad locomotora inducida por antagonismo simultaneo de los receptores D3 y D4. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10); la barra azul es la actividad locomotora inducida por anfetamina (2304±197 cuentas/50min, n=13); la barra roja representa la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D4 a 0.1mg/kg i.p. (3863±194 cuentas/50min, n=14); la barra verde olivo representa la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia del antagonista del receptor D3 el U-99194 A a 20mg/kg i.p. (3838±465 cuentas/min, n=8) y la barra rosa con franjas verticales representa la actividad locomotora inducida por anfetamina en presencia de los antagonistas de los receptores D3 y D4 (U-99194 A 20mg/kg y 0.1mg/kg i.p. respectivamente, 9857±1490 cuentas/50min, n=4). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01, **p<0.001 y ***p<0.0001. El # representa una diferencia significativa de ***p<0.0001 entre los grupos L-745,870/U-99194 A+Anfetamina V.S. Anfetamina, L 745,870 +Anfetamina y U-99194 A+ Anfetamina. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

11.1.3 Efecto de la activación indirecta de los receptores D3 y D4 por dopamina endógena en condiciones de sobreactivación de los receptores D1.

Como pudimos observar en las figuras 17 a 23 los receptores D3 y D4 están ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la activación de los receptores D1, otra manera de demostrar este efecto inhibitorio se muestra en la figura 24 en donde observamos una disminución en la actividad locomotora de un grupo de ratas con previa sobreactivación de los receptores D1 con SKF38393 (10mg/kg) luego de la administración de anfetamina (1mg/kg). (Basal 1093±120 cuentas/50min, SKF 38393 4416±577 cuentas/50min y SKF38393+Anf 2629±449 cuentas/50min). Basal vs SKF38393 ***p<0.0001, Basal vs SKF38393+Anf *p<0.01 y SKF 38393 vs SKF 38393+Anf *p<0.01 n=9-10 animales). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

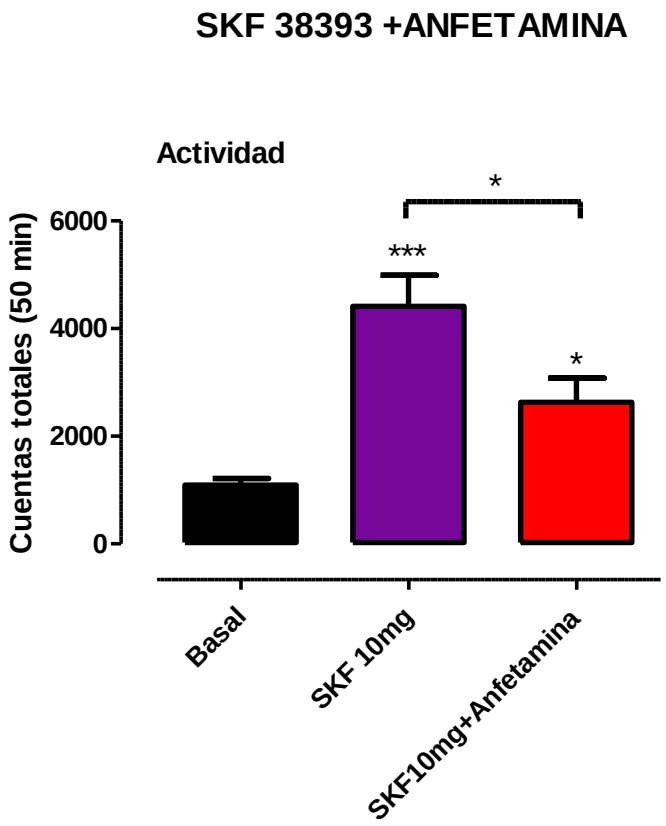

Figura 24. Representación grafica de las cuentas totales de actividad locomotora inducida por una dosis alta de SKF 383 93. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de ratas sin ningún tratamiento (1093±120 cuentas/50min, n=10), la barra morada representa la actividad locomotora inducida por una dosis alta del agonista D1 SKF 38393 10mg/kg i.p. (4416±577 cuentas/50min, n=10); la barra roja representa la actividad locomotora inducida por 10mg/kg de SKF38393 en presencia de 1mg/kg de anfetamina (2629±449 cuentas/50min, n= 9). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01 y ***p<0.0001. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

11.2 TONO DOPAMINÉRGICO DEPLETADO CON RESERPINA.

La otra estrategia que usamos para evaluar el papel de los receptores dopaminérgicos sobre la actividad locomotora fue depletar el sistema dopaminérgico por medio de reserpina y activar selectivamente a los receptores de interés por medio de sus agonistas selectivos.

11.2.1 Efecto de la activación selectiva de los receptores D1, D3 y D4 en ratas previamente reserpinizadas.

En la figura 25 podemos observar como los receptores D4 continúan ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la activación de los receptores D1 en condiciones de tono dopaminérgico depletado al ser coactivados con sus agonistas selectivos el PD 168, 077 (0.5mg/kg) y SKF 38393 (2mg/kg) se produce una disminución en la actividad locomotora, mientras que el receptor D3 esta potenciando los efectos estimulatorios del receptor D1 ya que cuando de coactivan con sus agonistas selectivos el PD 128 907 (0.5mg/kg) y el SKF 38393 (2mg/kg) hay un incremento en la actividad locomotora.

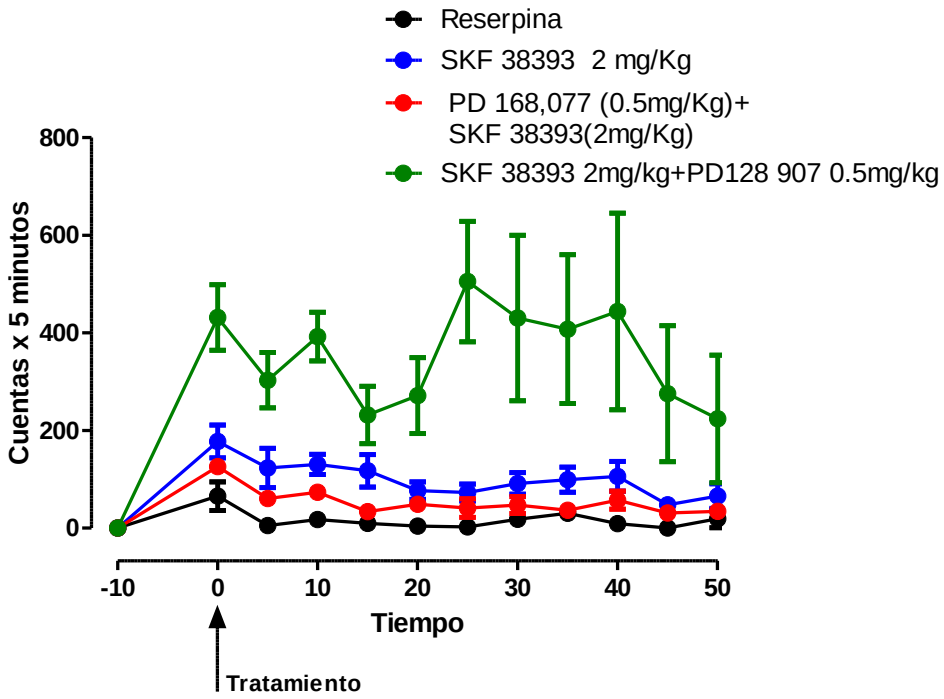

Figura 25. Curso temporal de la actividad locomotora de ratas previamente reserpinizadas en presencia de agonistas dopaminérgicos. La grafica de círculos negros representa la actividad locomotora de un grupo de ratas reserpinizadas (204±39 cuentas/50min, n=8); la grafica de círculos azules representa la actividad locomotora de ratas reserpinizadas en presencia del agonista del receptor D1el SKF38393 a 2mg/kg (1682±144 cuentas/50min, n=12); la grafica de círculos rojos representa la actividad locomotora de ratas reserpinizadas en presencia de los agonistas de los receptores D1 y D4 SKF38393 a 2mg/kg y el PD 168,077 a 0.5mg/kg respectivamente (1047±74 cuentas/50min, n=7) y la grafica de círculo verdes representa la actividad locomotora de ratas previamente reserpinizadas en presencia de los agonistas de los receptores D1 y D3 el SKF 38393 a 2mg/kg y el PD 128 907 a 0.5 mg/kg (3114±409 cuentas/50min, n=8).

Tal como se observa en el curso temporal la representación grafica de las cuentas totales de actividad locomotora inducida tras la activación de los receptores D1 y D3 en ratas previamente reserpinizadas es similar, pero mas fácil de ver (figura 26). El receptor D3 se encuentra potenciando la actividad locomotora estimulada por la activación del receptor D1 ya que cuando se coactivan hay una potenciación de la actividad locomotora con dos distintos agonistas dopaminérgicos del receptor D3 el PD 128 907 (0.5mg/kg) y el 7-OH-DPAT (0.25mg/kg) y con el agonista del receptor D1 el SKF 38393 (2mg/kg). (Reserpina 204±39 cuentas/50min, SKF38393 1682±144 cuentas/50min, SKF38393+ PD 128907 3114±409 cuentas/50min y SKF38393+7-OH-DPAT 3755±823 cuentas/50min. Basal vs SKF38393 *p<0.01, SKF38393 vs SKF38393+PD128907 ***p<0.0001 y SKF38393vs SKF38393+7-OH-DPAT ***p<0.0001 n=6-12 animales). Anova seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

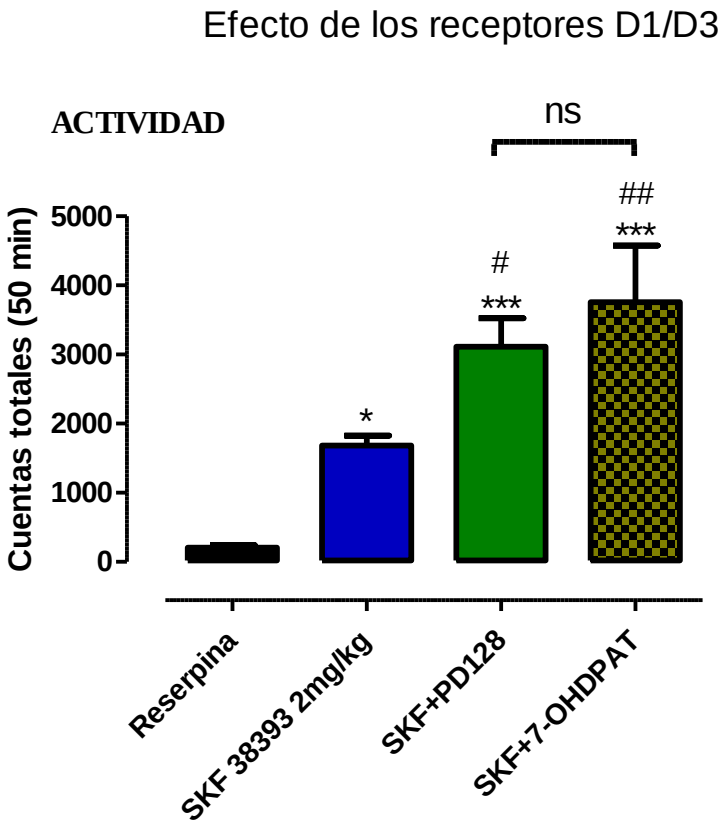

Figura 26. Representación grafica de la actividad locomotora de ratas previamente reserpinizadas en presencia de distintos agonistas dopaminérgicos. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de rata reserpinizadas sin ningún tratamiento (204±39 cuentas/50min, n=8); la barra azul representa la actividad locomotora de ratas reserpinizadas en presencia de 2mg/kg i.p. del agonista del receptor D1 el SKF 38393 (1682±144 cuentas/50min, n=12); las barras verdes representan la actividad locomotora de ratas reserpinizadas en presencia de los agonistas de los receptores D3 el PD 128 907 0.5mg/kg (3114±409 cuentas/50min, n=8) y el 7-OH-DPAT 0.25mg/kg i.p.(3755±823 cuentas/50min, n=6). Los asteriscos representan una diferencia significativa de *p<0.01 y ***p<0.0001. # representa *p<0.01 y ## representa **p<0.001 entre los grupos SKF 38393+PD128907 y SKF 38393+7-OH-DPAT v.s. SKF 38393. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Por su parte el receptor D4 continúa ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la activación del receptor D1 como se muestra en la figura 27, de manera independiente del tono dopaminérgico ya que cuando se coactivan con PD 168, 077 (0.5mg/kg) y SKF 38393 (2mg/kg) respectivamente, se produce una disminución de la actividad locomotora. (Reserpina 204±39 cuentas/50min, SKF 38393 1682±144 cuentas/50min y SKF38393+PD 168, 077 1047±74 cuentas/50min. Reserpina vs SKF38393 ***p<0.0001, Reserpina vs SKF38393+PD 168,077 ***p<0.0001 y SKF38393 vs SKF38393+PD 168, 077 **p<0.001 n=7-12 animales). Anova seguida de una prueba de comparación multiple de Tukey.

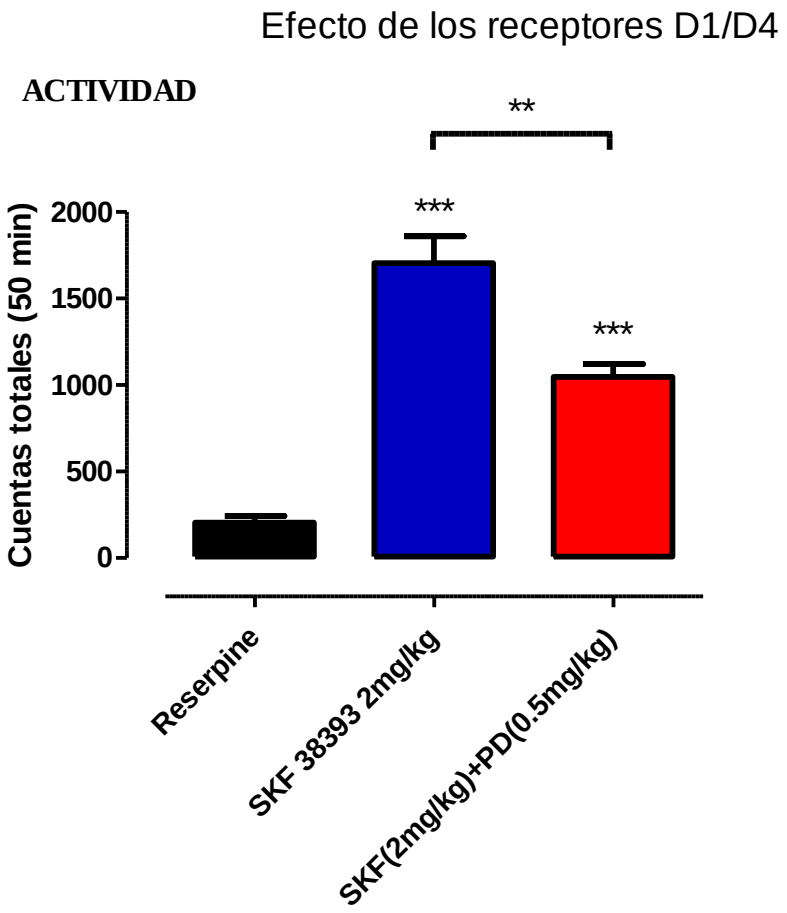

Figura 27. Representación grafica de la actividad locomotora de ratas previamente reserpinizadas en presencia de distintos agonistas dopaminérgicos. La barra negra representa la actividad locomotora de un grupo de rata reserpinizadas sin ningún tratamiento (204±39 cuentas/50min, n=8); la barra azul representa la actividad locomotora de ratas reserpinizadas en presencia de 2mg/kg i.p. del agonista del receptor D1 el SKF 38393 (1682±144 cuentas/50min, n=12); y la barra roja representa la actividad locomotora de ratas reserpinizadas en presencia de los agonistas de los receptores D1 y D4 (2mg/kg i.p. de SKF 38393 y 0.5mg/kg i.p. de PD 168, 077 (1047±74 respectivamente, n=7). Los asteriscos representan una diferencia significativa de **p<0.001 y ***p<0.0001. ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a la gran importancia de los receptores dopaminérgicos tanto fisiológica como patológicamente es necesario lograr una caracterización del papel funcional de estos receptores hasta el momento inconclusa y muy controversial. Clásicamente gracias al modelo de organización funcional de los ganglios basales se tiene por sentado que la activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 ejercen un efecto sinergista para promover el movimiento (Gershanik O. et al., 1983; Jackson D.M. et al., 1994), sin tomar en cuenta la presencia a distintos niveles de los ganglios basales de los receptores D3 y D4, teniendo una importante localización, particularmente a nivel de los núcleos de salida de la información del circuito la SNr/GPi sin saber hasta la fecha su función exacta en este contexto. Los resultados que obtuvimos del papel de los receptores D1, D2, D3 y D4 sobre la conducta motora indican que los receptores D4 en cualquier condición modulan la actividad locomotora estimulada por los receptores D1, en tanto que los receptores D3 tienen un efecto opuesto dependiendo de la cantidad de dopamina presente, i.e. tono dopaminérgico.

Efecto del tono dopaminérgico elevado y los receptores D1, D2, D3 Y D4.

En la primera parte de nuestro trabajo que consiste en la evaluación del bloqueo de los receptores D1, D2, D3 y D4 sobre la actividad locomotora estimulada por anfetamina podemos observar el papel de los distintos receptores dopaminérgicos. De las figuras 17, 18 y 19, podemos concluir prácticamente tres aspectos. El primero es que los efectos estimulatorios sobre la actividad locomotora de la anfetamina se deben básicamente a la activación de los receptores D1, (figura 17) donde se puede observar el curso temporal del experimento, así como en la grafica donde se registra el total de actividad motora (figura 18) y el desplazamiento horizontal (figura19), en esta ultima el comportamiento a la administración de los fármacos fue prácticamente el mismo, por esa razón el desplazamiento horizontal ya no se tomo en cuenta para los posteriores resultados.

El segundo aspecto es que el receptor D2 no interviene en los efectos estimulatorios de la anfetamina sobre la actividad locomotora ya que cuando a un grupo de ratas se les bloquea el receptor D2 con su antagonista selectivo el L 741626 la respuesta estimulatoria de la anfetamina no se ve modificada. La aparente falta del efecto de los receptores D2, sin embargo no esta descartada en esta estrategia experimental. Como ya se mencionó anteriormente la literatura muestra que la activación de los receptores D1 y D2 ejercen un efecto sinergista sobre la actividad locomotora, pero nosotros no podemos desenmascarar ese efecto sinergista quizá debido al incrementado tono dopaminérgico del sistema, es decir la administración de anfetamina activa en gran medida a los receptores D1 de la vía directa promoviendo el movimiento a tal nivel que el sistema no necesita del efecto sinergista de la activación del receptor D2, por tal razón al ser bloqueado por su antagonista selectivo no es posible mostrar su efecto. Para resolver esta paradoja se tiene planeado realizar experimentos en donde a un grupo de ratas previamente reserpinizadas se les activen los receptores D1 con su agonista selectivo el SKF 38393 a dosis crecientes junto con la administración concomitante de una dosis fija del agonista selectivo del receptor D2 el Sumarinole y determinar hasta que punto la activación de ambos receptores genera un efecto sinergista sobre el movimiento y también hasta que dosis se pierde dicho efecto. A su vez el papel modesto del receptor D2 en la actividad locomotora no es posible observarlo en la interacción entre antagonistas D4 y D2 estudiada en la figura 22. Nótese como el bloqueo del receptor no modificó la respuesta del bloqueo del receptor D4. Sin embargo para desenmascarar el papel del receptor D2 es necesario como indicamos mayor experimentación.

El tercer aspecto es que los receptores D3 y D4 se encuentran ejerciendo un efecto modulador inhibitorio sobre los efectos estimulatorios de la activación de los receptores D1 ya que cuando se bloquean con sus antagonistas selectivos el U-99194 A y el L-745,870 respectivamente se puede observar una potenciación en la actividad locomotora inducida por anfetamina (figuras 17, 18 y 19). Estos efectos antagónicos pueden hallar su base en la presencia de estos receptores en aferentes a los núcleos de salida como la SNr que expresan presinápticamente estos receptores, los D4 en las vía pálido-nigral y los D3 en la subtalamo nigral, cuya modulación se hace evidente cuando existen elevadas concentraciones de dopamina.

La activación de estos receptores en el núcleo de salida, disminuirá la liberación de GABA, neurotransmisor que al incrementarse en estos núcleos estimula la actividad locomotora, una disminución provocada por la inhibición presináptica de los receptores D3 y D4 tendría un efecto opuesto evidente a la estimulación incrementada del receptor D1. La manera en que el sistema se da cuenta de que existe una actividad incrementada de receptores D1 está por determinarse, circuitos no descritos o persistentemente activados por la dopamina podrían ser los responsables, sin embargo, para dilucidar lo anterior es necesario la realización de mas experimentos. Por lo cual lo siguiente fue evaluar las posibles interacciones entre receptores D1/D3, D1/D4, D2/D4 y D3/D4 ya que podrían dar luz sobre los efectos del control motor de los receptores D3 y D4, debido a que posiblemente su efecto ocurre en sistemas de control paralelos.

Interacciones de los receptores D1/D3 y D1/D4 sobre la actividad locomotora inducida por anfetamina.

Como podemos observar en la figura 20, el receptor D3 ejerce un efecto modulador sobre la activación del receptor D1 ya que cuando se coadministran sus antagonistas, el U-99194 A y el SCH 23390 respectivamente (barra verde) solo es posible observar el efecto del bloqueo del receptor D1, si el efecto modulador no fuera sobre la activación del receptor D1 se podría observar un efecto parcial sobre la conducta motora (incremento de la actividad locomotora) por el bloqueo del receptor D3. Resultados que concuerdan con los obtenidos por N. Waters, et al., 1993 y D. Boulay, et al., 1999 donde evidencian un papel inhibitorio del receptor D3 sobre la actividad locomotora, en nuestro caso indican un efecto inhibitorio del receptor D3 sobre los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1 y apoyan mas la idea de un sistema paralelo al receptor D1 que inhibe la actividad locomotora por receptores D3.

Contrario a lo obtenido por Erlij, et al., 2012 en donde no se logra evidenciar el papel del receptor D4 sobre la actividad locomotora, nosotros, gracias al incremento del tono dopaminérgico con anfetamina y por nuestra hipótesis de que el receptor D4 actúa como un modulador fino sobre la conducta motora, bloqueando al receptor D4 en un sistema de tono dopaminérgico incrementado pudimos evidenciar un efecto modulador inhibitorio sobre la activación del receptor D1 (figura 21) ya que cuando se coadministran sus antagonistas (barra morada) el L-745,870 0.1mg/kg i.p.y el SCH 23390 0.1mg/kg i.p, respectivamente, sólo es posible observar el efecto del bloqueo del receptor D1.

Si el efecto modulador no fuera sobre la activación del receptor D1 se podría observar un efecto parcial sobre la conducta motora (incremento) por el bloqueo del receptor D4 y como en el caso del receptor D3 indican un sistema paralelo de inhibición de la actividad motora sobre la actividad despertada por el receptor D1. Este efecto de los receptores D4 sobre la actividad motora se ve reforzado por los hallazgos en ratas reserpinizadas en donde la activación del receptor D4 continua oponiéndose a los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1 (figuras 25 y 27).

En la figura 23, es posible observar un efecto inhibitorio de los receptores D3 y D4 sobre la actividad locomotora y a su vez, este efecto del antagonismo único del receptor D3 y del receptor D4 (barra verde olivo y roja respectivamente) se ve sumado cuando se antagonizan simultáneamente ambos receptores (barra rosa con líneas verticales), lo cual habla de dos sistemas de inhibición paralelos de los receptores D3 y D4 sobre la actividad locomotora, es decir, los receptores se encuentran en distintas neuronas y de alguna manera ejercen su efecto inhibidor, esto podría explicarse a nivel de los núcleos de salida la SNr/GPi ya que es a este nivel en donde desemboca toda la información proveniente del circuito de los ganglios basales y es determinante para la generación o inhibición de la actividad locomotora, así pues nosotros creemos que a nivel de los núcleos de salida existe una especie de suma algebraica entre los efectos estimulatorios de los receptores D1 de las neuronas estriado-nigrales y los efectos inhibitorios de los receptores D3 pero de la proyección del Núcleo Accumbens (ya que se cree que esta proyección es la responsable de los efectos motores de las drogas de abuso) hacia la SNr así como los efectos inhibitorios de la activación de los receptores D4 de las proyecciones Pálido-nigrales y en donde lo que va a determinar si se genera o se inhibe el movimiento es la cantidad de GABA liberada en estos núcleos de salida SNr/GPi.

Reforzando más la idea de sistemas paralelos de inhibición, en la figura 24 mostramos una estrategia en la que pretendimos sobreactivar a los receptores D1 estriadonigrales, es decir sobreactivar la vía directa, como es de esperarse tras la administración de la dosis alta del agonista D1 se produjo un pronunciado incremento de la actividad locomotora, y paradójicamente, la consecuente administración de anfetamina produjo una inhibición de la respuesta motora provocada por la activación indirecta de los receptores D3 y D4 por la dopamina endógena.

Estos resultados en particular son bastante interesantes ya que es la primera evidencia conductual en la cual tras la administración de un psicoestimulante a un grupo de animales sanos se produce una disminución de la actividad locomotora, lo cual nos habla de un posible mecanismo de acción de estos fármacos en el tratamiento del TDAH hasta la fecha desconocido.

La respuesta paradójica de los receptores D3 en ratas reserpinizadas.

La depleción dopaminérgica modifica los efectos motores de los receptores D3 y no de los D4 ya que como mostramos en la figura 26, la activación de los receptores D3 potenció el efecto de la activación de los receptores D1. Pero de estos resultado surge una pregunta ¿Por qué el receptor D3 ejerce un efecto inhibitorio sobre los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1 cuando el tono dopaminérgico es normal o incrementado y de manera opuesta cuando el tono dopaminérgico es depletado el papel del receptor D3 cambia y ahora se encuentra potenciando los efectos estimulatorios del receptor D1?

La respuesta a esta pregunta es el heterodímero D1-D3 que se esta presente en las terminales estriadonigrales, en el trabajo de Marcellino, et al (2008), realizan una caracterización de este heterodímero en sistemas de expresión heterólogos por medio de estudios de FRET, BRET y Binding evidenciando la formación de este heterodímero y a su vez identifican su huella bioquímica la cual es que tras la coactivación de ambos receptores el receptor D3 se encuentra potenciando los efectos estimulatorios del receptor D1, desde la formación de AMPc, liberación de [^{3}H]GABA en terminales estriadonigrales (Avalos-Fuentes, et al.., 2008) y potenciando la actividad locomotora.

El hecho de que podamos observar el efecto del heterodímero en función del tono dopaminérgico muy probablemente se deba a la presencia de la cinasa de calcio calmodulina CAMKII, esta cinasa se activa en presencia de calcio y cuando está activa se encuentra modulando de manera negativa la señalización del heterodímero, por lo tanto, en condiciones de actividad locomotora normal o incrementada (tono dopaminérgico normal o alto) las neuronas de la vía directa estriadonigral están en constante actividad, se están despolarizando constantemente, esta despolarización permitirá la entrada de calcio al citosol, lo cual activará a la CAMKII, una vez activa esta cinasa se une a la tercera asa del receptor D3 que está formando un heterodímero con el receptor D1 e impide su señalización como complejo, lo que nosotros especulamos es que los efectos inhibitorios de la activación del receptor D3 se deban quizá a la activación de los receptores D3 de las terminales del Núcleo Accumbens hacia la SNr ya que en esas proyecciones no se ha evidenciado la formación del heterodímero D1-D3. Por el contrario, cuando la actividad locomotora esta disminuida (tono dopaminérgico depletado) las neuronas de la vía directa estriado nigral no se encuentran activas ya que no hay dopamina que este activando a los distintos receptores, por lo tanto no se produce despolarización neuronal y se impide la entrada de calcio al citosol, sin calcio la CAMKII no se activará y si no está activa no es posible ejercer su efecto modulador negativo sobre el heterodímero D1-D3 y en esta situación es posible observar los efectos potenciadores de la coactivación de los receptores D1 y D3 con sus agonistas selectivos el SKF 38393 2mg/kgi.p. para el receptor D1 y con dos distintos agonistas de los receptores D3 el PD 128,907 0.5mg/kg i.p. y el 7-OH-DPAT 0.25mg/kg i.p. potenciando la actividad locomotora. Estas especulaciones, por supuesto, requieren mayor experimentación.

13. CONCLUSIONES

- Los receptores D4 ejercen un efecto inhibitorio u opuesto a la activación de los receptores D1 de manera independiente del tono dopaminérgico, sin embargo, es necesario modificarlo para desenmascarar su función.

- Los receptores D3 ejercen un efecto inhibitorio sobre la activación de los receptores D1 en condiciones de tono dopaminérgico incrementado y también un efecto potenciador sobre la activación de los receptores D1 en condiciones en las que el tono dopaminérgico ha sido depletado.

REFERENCIAS

Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, Lachowicz JE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR, Gerfen CR, Westphal H, Fuchs S (1996): A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. Proc Natl Acad Sci USA 93:1945–1949.

Acosta-García, J., Hernández-Chan, N., Paz-Bermúdez, F., Sierra, A., Erlij, D., Aceves, J., & Florán, B. (2010). D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. Neuropharmacology, 57(7-8), 725–30.

Aizman O, Brismar H, Uhle'n P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000): Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. Nature Neurosci 3:226–230.

Alexander G.E, DeLong, M.R. Strick, P.L Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. Annu. Rev. Neurosci. 9; (1986), 357-381.

Ariano MA, Stromski CJ, Smyk-Randall EM, Sibley DR (1992): D2 dopamine receptor localization on striatonigral neurons. Neurosci Lett 144:215–220. 62.- Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST (1992): Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. Proc Natl Acad Sci USA 89:10178–10182.

Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol H.H. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. J. Neurochem. 65, (1995), 1157-1165.

Avalos Fuentes. Papel del receptor dopaminérgico D3 sobre la supersensibilidad de la vía estriado-nigral inducida por denervación. Tesis de maestría 2008.

Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995): Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 377:424–428.

Barkley, R. A. (1990) Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook For Diagnosis And Treatment (Guilford Press, New York).

Breese GR, Duncan GE, Napier TC, Bondy SC, Iorio LC, Mueller RA (1987): 6-hydroxydopamine treatments enhance behavioral responses to intracerebral microinjection of D1- and D2-dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. J Pharmacol Exp Ther 240:167–176

Boulay D. R. Depoortere W. Rostene G. Perrault D.J. Sanger. Dopamine D3 receptor agonists produce similar decreases in body temperature and locomotor activity in D3 knock-out and wild-type mice Neuropharmacology 38 (1999) 555–565

Bouthenet ML, Martres MP, Sales N, Schwartz JC (1987): A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [125I]iodosulpride. Neuroscience 20:117–155.

Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991): Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. Brain Res 564:203–219.

Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988): Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. Nature 336:783–787.

Challman T.D., Lipsky J.J. Methylphenidate: its pharmacology and uses. Mayo Clin. Proc. 75; (2000), 711-721.

Chandler CJ, Wohab W, Starr BS, Starr MS (1990): Motor depression: a new role for D1 receptors? Neuroscience 38:437–445.

Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993): Molecular diversity of the dopamine receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol 33:281–307.

Cruz-Trujillo. Papel del receptor D4 en la sustancia nigra pars reticulada de la rata. Tesis de maestría 2007.

Cohen, G. (1984). Oxy-radical toxicity in catecholamine neuronsNeurotoxicology *5*, 77–82.

Cooper J.R, Bloom F.E, Roth R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. 7th. Ed. New York/Oxford, Oxford University Press. (1996). 293-351.

Cummings J.L. Frontal- subcortical circuits and human behavior, Arch. Neurol. 50. (1993), 873-880.

Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989): The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. EMBO J 8:4025–4034.

Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT Jr, Bates MD, Caron MG (1990): Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. Nature 347:72–76.

Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC (1997): Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. Mol Brain Res 45:1–12.

Diaz, J., Levesque, D., Lammers, C.H., Griffon, N., Martres, M.P., Schwartz, J.C., and Sokoloff, P. (1995). Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. Neuroscience *65*, 731- 45.

Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Bartlett PF, Jose PA, Sibley DR, Westphal H (1994): Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. Proc Natl Acad Sci USA 91:12564–12568.

Dreher JK, Jackson DM (1989): Role of D1 and D2 dopamine receptors in mediating locomotor activity elicited from the nucleus accumbens of rats. Brain Res 487:267–277.

Elliot EE, Sibley DR, Katz JL (2003): Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D(5) receptor knockout mice. Psychopharmacology (Berl) 169:161–168.

Erlij D, Jacqueline A. G, Martín R. M, Brenda G. H, Erick E. P, Jorge A, Benjamín F. 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 (2012) 1111-1118.

Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001): Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. Am J Psychiatry 158: 1052–1057.

Faraone S.V, Sergeant J, Gillbertet C, Biederman J. The worldwide prevalence of ADHD: is itan American condition? World Psychiatry. 2 (2003), 104-113.

Feldman R.S., Meyer J.S., Quenzer L.F. Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, Sinauer. (1997), 277-344.

Filloux FM, Wamsley JK, Dawson TM (1987a): Dopamine D-2 auto- and postsynaptic receptors in the nigrostriatal system of the rat brain: localization by quantitative autoradiography with [3H] sulpiride. Eur J Pharmacol 138:61–68.

Fisher RS, Levine MS, Sibley DR, Ariano MA (1994): D2 Dopamine receptor protein location: Golgi impregnation-gold toned and ultrastructural analysis of the rat neostriatum. J Neurosci Res 38:551–564.

Floran, B., Floran, L., Erlij, D., and Aceves, J. (2004). Activation of dopamine D4 receptors modulates [^{3}H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus . Neuropharmacology 46, 497-503.

Floran, B., Floran, L., Erlij, D., and Aceves, J. (2004). Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced. Eur J Pharmacol *498*, 97-102.

Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., and Langston, J.W. (1993). Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonismand Parkinson's disease: Neuropathologic considerations. AdvNeurol. *60*, 600–608.

Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. J. Neuro-pathol. Exp. Neurol. *55*, 259–272.

Gasca-Martinez, D., Hernandez, A., Sierra, A., Valdiosera, R., Anaya-Martinez, V., Floran, B., Erlij, D., and Aceves, J. (2010). Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors. Neuroscience *169*, 1672-81.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990): D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. Science 250:1429–1432.

Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, *34*, 441–66.

Gershanik O.R, Heikkila E, Duvoisin R.C. Behavioralcorrelations of dopamine receptor activation. *Neurology* 33: 1489–1492, 1983.

Gingrich, J. A. & Caron M.G. Recent advances in the molec- ular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 299– 321, 1993.

Grandy DK, Zhang Y, Bouvier C, Zhou QY, Johnson RA, Allen L, Buck K, Bunzow JR, Salon J, Civelli O (1991): Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. Proc Natl Acad Sci USA 88:9175–9179.

Hernandez-Lopez, S., Bargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A., and Galarraga, E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca2+ conductance. J Neurosci *17*, 3334-42.

Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KKL, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995): Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. J Neurosci 15:5222–5237.

Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H. Central mechanisms of motor learning. Curr Opin Neurobiol 2002;12:217– 222.

Hoffman DC, Beninger RJ (1985): The D1 dopamine receptor antagonist, SCH 23390 reduces locomotor activity and rearing in rats. Pharmacol Biochem Behav 22:341–342.

Hollon TR, Bek MJ, Lachowicz JE, Ariano MA, Mezey E, Ramachandran R, Wersinger SR, Soares-da- Silva P, Liu ZF, Grinberg A, Drago J, Young WS, 3rd, Westphal H, Jose PA, Sibley DR (2002): Mice lacking D5 dopamine receptors have increased sympathetic tone and are hypertensive. J Neurosci 22:10801–10810.

http://www.innn.salud.org.mx.

Hurd Y.L. Ungersted U. In vivo neurochemical profile of dopamine uptake inhibitors and releasers in rat caudate- putamen. Eur. J. Pharmacol, 166, (1989), 251-260.

Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994): Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. Pharmacol Ther 64:291–370.

Joyce J, Loeschen SK, Marshall JF (1985): Dopamine D-2 receptors in rat caudate-putamen: the lateral to medial gradient does not correspond to dopaminergic innervation. Brain Res 338:209–218.

Kalivas P.W. Neural basis of behavioral sensitization to cocaine R.P. Hammer (Ed.), The Neurobiology of Cocaine, CRC Press, Boca Raton (1995), pp. 81–98

Kebabian JW, Calne DB (1979): Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93–96.

Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998): Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. Proc Natl Acad Sci USA 95:7731–7736.

Khan Z. U. Antonia Gutierrez, Rosa Martin, Antonio Peñafiel, Alicia Rivera, Adelaida de la Calle. Differential Regional and Cellular Distribution of Dopamine D2-Like Receptors: An Immunocytochemical Study of Subtype-Specific Antibodies in Rat and Human Brain. The Journal of Comparative Neurology 402:353–371 (1998).

Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, Goldman-Rakic PS (2001): An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci USA 98:1964–1969.

Le Moine C, Tison F, Bloch B (1990a): D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. Neurosci Lett 117:248–252.

Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, Bloch B (1990b): Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. Proc Natl Acad Sci USA 87:230–234.

Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991): Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA 88:4205–4209.

Le Moine C, Bloch B (1995): D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. J Comp Neurol 355:418–426.

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993): Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 90:8861–8865

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993): Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 90:8861–8865.

Le’vesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992): Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7- [3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. Proc Natl Acad Sci USA 89:8155–8159.

Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E (1997): Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 388:586–589.

Maltais S, Coˆ te' S, Drolet G, Falardeau P (2000): Cellular colocalization of dopamine D1 mRNA and D2 receptor in rat brain using a D2 dopamine receptor specific polyclonal antibody. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat 24:1127–1149.

Mannuzza, S., Klein, R. G., Bessler, A., Malloy, P.&Hynes, M. E. (1997) Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry **36,** 1222–1227.

Marcellino D, Sergi Ferre, Vicent Casado, Antonio Corte´s, Bernard Le Foll, Carmen Mazzola, Filippo Drago, Oliver Saur, Holger Stark, Aroa Soriano, Chanel Barnes, Steven R. Goldberg§, Carme Lluis, Kjell Fuxe, and Rafael Franco Identification of Dopamine D1–D3 Receptor Heteromers: Indications for a role of synergistic D1–D3 receptor interactions in the striatum. The Journal of Biological Chemistry Vol. 283, no. 38, pp. 26016–26025, September 19, 2008

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

Monsma FJ, Jr, Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR (1990): Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. Proc Natl Acad Sci USA 87:6723–6727.

Montmayeur JP, Guiramand J, Borrelli E (1993): Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. Mol Endocrinol 7:161–170.

Morelli M, Carboni E, Devoto S, Di Chiara G (1987): 6-Hydroxydopamine lesions reduce specific [3H]sulpiride binding in the rat substantia nigra: direct evidence for the existence of nigral D-2 autoreceptors. Eur J Pharmacol 140:99–104.

Obeso J.A. et al., Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease, Movement Disorders Vol. 23, Suppl. 3, 2008, pp. S548–S559.

O'Dowd, B. F. Structure of dopamine receptors. J. Neurochem. 60: 804–816, 1993.

Pasupathy A, Miller EK. Different time courses of learningrelated activity in the prefrontal cortex and striatum. Nature 2005;433:873–876.

Perreault, M. L., Hasbi, A., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2011). The dopamine D1-D2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, *5*(May), 31.

Richtand N.M. Behavioral Sensitization, Alternative Splicing, and D3 Dopamine Receptor-Mediated Inhibitory Function Neuropsychopharmacology (2006) 31, 2368–2375.

Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH (1999): Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. Addict Biology 4:203–207.

Roman T. Rohde L.A, Hutz M.H. Polymorphisms of the dopamine transporter gene: influence on response to methylphenidate in attention deficit-hyperactivity disorder. Am. J. Pharmacogenomics. 4(2); (2004), 83-92.

Rommelfanger, K. S., & Wichmann, T. (2010). Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. Frontiers in neuroanatomy, 4(October), 139.

Rondou P; Guy Haegeman; Kathleen Van Craenenbroeck. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. Cellular and Molecular Life Sciences. Cell. Mol. Life Sci. (2010) 67:1971–1986

Ronduo P., The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties, Cell. Mol. Life Sci. (2010) 67:1971–1986.

Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997): Mice Lacking Dopamine D4 Receptors Are Supersensitive to Ethanol, Cocaine, and Methamphetamine. Cell 90:991–1001.

Rubinstein M et al. Dopamine D4 Receptor-Deficient Mice Display Cortical Hyperexcitability The Journal of Neuroscience, June 1, 2001, *21*(11):3756–3763.

Sesack SR, Aoki C, Pickel VM (1994): Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. J Neurosci 14:88–106.

Seeman P, Guan H-C, Van Tol HHM (1993): Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. Nature 365:441–445.

Seger CA. The basal ganglia in human learning. Neuroscientist 2006;12:285–290

Smith, Y., & Villalba, R. (2008). Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. Movement disorders; official journal of the Movement Disorder Society, 23 Suppl 3, S534–47.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. Neuroscience 1998;86:353–358.

Sokoloff P, Martres MP, Giros B, Bouthenet ML, Schwartz JC. (1992). The third dopamine receptor (D3) as a novel target for antipsychotics. Biochem Pharmacol 43: 659–666.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990): Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. Nature 347:146–151.

Sokoloff P, Schwartz JC (2003): The dopamine D3 Receptor and its implication in neuropsychiatric disorders and their treatments. In: Di Chiara G (Ed), Handbook of Experimental Pharmacology, Dopamine in the CNS I, Vol. 154, pp. 185–221. Springer, Berlin.

Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978): Studies on the paharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. Adv Biochem Psychopharmacol 19:155–165.

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). Sinuclein in filamentous inclusions of Lewybodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodiesProc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 6469–6473.

Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. J Neurosci 16: 6579–6591.

Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Geroge SR, Torchia J, Van Tol HHM, Niznik HB (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. Nature 350:614–619.

Svensson K, Carlsson A, Waters N (1994): Locomotor inhibition by the D3 ligand R-(þ)-7-OH-DPAT is independent of changes in dopamine release. J Neural Transm 95:71–74.

Tan S, Hermann B, Borrelli E (2003): Dopaminergic mouse mutants: investigating the roles of the different dopamine receptor subtypes and the dopamine transporter. Int Rev Neurobiol 54:145–197.

Teo et al., Neurobehavioral effects of racemic *threo*-methylphenidate and its D and L enantiomers in rats Pharmacology Biochemistry and Behavior Volume 74, Issue 3, February 2003, Pages 747–754.

Terje Sagvolden et al., A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. Behavioral and brain sciences (2005) 28, 397-468.

Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Jr, Caron MG (1991): Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene enconding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. Proc Natl Acad Sci USA 88:7491–7495.

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. Nature 350:610–614.

Van Tol H.H. et al., Multiple dopamine D4 variants in the human population. Nature 358, (1992), 149-152.

Viggiano D, Lucia A. Ruocco, Adolfo G. Sadile, Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder, Neuroscience and Biobehavioral Reviews 27 (2003) 623–637.

William Dauer and Serge Przedborski. Parkinson's Disease: Mechanisms and ModelsNeuron, Vol. 39, 889–909, September 11, 2003, Copyright 2003 by Cell Press.

Wang H, Pickel VM (2002): Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. J Comp Neurol 442:392–404

Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, Caarlsson A (1993): The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. J Neural Transm 94:11–19.

Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S (1994a): Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. Cell 79:729–742.

Yung KKL, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI (1995): Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. Neuroscience 65:709–730.

Zametkin A.J. and Rapoport J.L. Neurobiology of attention deficit disorder with hyperactivity: where have we come in 50 years? J. Am. Child Adolesc Psychiatry. 26(5), (1987), 676-686.

Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HHM, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O (1990): Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. Nature 347:76–80.