



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**MODULACIÓN DEL DÍMERO D1-D3 POR LA CaMKII EN
CONDICIONES NORMALES Y DE PÁRKINSON
EXPERIMENTAL**

T E S I S

Que presenta

SANTIAGO IVÁN LOYA LÓPEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Benjamín Florán Garduño

México, DF.

Diciembre, 2012

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	A
RESUMEN.....	B
ABSTRACT.....	D
1. CONTROL MOTOR.....	1
1.1 Sistema extra-piramidal.....	2
1.1.1 Cerebelo.....	2
1.1.2 Ganglios basales.....	2
<i>1.1.2.1 Núcleo estriado.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2.2 Núcleo subtalámico.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2.3 Globo pálido.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2.3 Sustancia nigra.....</i>	<i>6</i>
1.1.3 Organización funcional de los ganglios basales.....	7
2. LA DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES.....	9
2.1 Receptores a dopamina.....	10
2.2 Localización de los receptores a dopamina en los ganglios basales.....	11
2.2.1 Receptores de la familia D1.....	11
2.2.2 Receptores de la familia D2.....	12
<i>2.2.2.1 Receptores D2.....</i>	<i>12</i>
<i>2.2.2.2 Receptores D3.....</i>	<i>13</i>
<i>2.2.2.3 Receptores D4.....</i>	<i>14</i>

2.3 Interacciones proteína-proteína de los receptores dopaminérgicos.....	14
3. INTERACCIÓN HETERODIMÉRICA DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1-D3.....	17
3.1 Implicaciones transduccionales de la heteromerización D1-D3.....	18
3.2 Implicaciones conductuales de la heteromerización D1-D3.....	19
4. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	21
4.1 El heterodímero D1-D3 en las terminales estriado nigrales.....	21
5. JUSTIFICACIÓN.....	26
6. HIPÓTESIS.....	26
7. OBJETIVO GENERAL.....	27
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Animales de experimentación.....	28
Lesión con 6-hidroxidopamina.....	28
Prueba conductual (Conducta de giro).....	29
Obtención del tejido.....	29
Obtención de la fracción sinaptosomal.....	30
Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	30
Electroforesis.....	31

Transferencia.....	31
Incubación con anticuerpos.....	32
Soluciones utilizadas.....	33
10. RESULTADOS.....	34
Efecto de la despolarización en la estructura D1-D3 en el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas.....	34
Efecto de la despolarización en la interacción CaMKII-D3 en el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas.....	38
Efecto de la despolarización en la estructura D1-D3 en el lado denervado de ratas hemiparkinsónicas.....	42
Efecto de la despolarización en la interacción CaMKII-D3 en el lado denervado de ratas hemiparkinsónicas.....	46
11. DISCUSIÓN.....	50
Efecto de la despolarización en la interacción D1-D3.....	51
Impacto de la denervación dopaminérgica en la interacción D1-D3.....	53
Efecto de la despolarización en la interacción CaMKII-D3.....	56
Efecto de la denervación sobre la interacción CaMKII-D3.....	58
12. CONCLUSIONES.....	60
13. BIBLIOGRAFÍA.....	61

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio # 4 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del D.C Benjamín Florán Garduño y con el proyecto financiado por CONACYT.

ABREVIATURAS

AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AC	Adenililciclase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AVT	Área Ventral Tegmental
GB	Ganglios Basales
DA	Dopamina
DYN	Dinorfina
ENK	Encefalina
EP	Enfermedad de Párkinson
EST	Núcleo Estriado
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA	Ácido Gamma-Amino Butírico
GB	Ganglios Basales
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
Gpe	Globo pálido externo
Gpi	Globo pálido interno
GRK	Cinasas Reguladoras de GPCR's
Ki	Constante de inhibición
L-DOPA	L-Dihidroxifenilalanina
MSN	Neuronas espinosas medianas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
SP	Sustancia P
TH	Tirosina Hidroxilasa
6-OHDA	6-Hidroxidopamina

RESUMEN

La proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) es un componente central en la transmisión sináptica, a través de sus cuatro isoformas, α , β , γ y δ regula procesos de plasticidad neuronal, así como procesos de aprendizaje y memoria. En neuronas del núcleo accumbens la isoforma alfa de esta cinasa, al ser activada, es capaz de fosforilar al receptor dopaminérgico D3 límbico en su tercer asa intracelular a través de una unión física, dicha interacción lleva a la inhibición de las acciones de este receptor, lo que es crítico para la integración de la señalización que lleva al control conductual.

Recientemente se ha aportado evidencia de la influencia de la CaMKII sobre la actividad del heterodímero D1-D3, complejo proteico que ha sido identificado de manera pre-sináptica en las terminales estriado nigrales, y cuya asociación conlleva a una potenciación de los efectos que ejerce por si solo el receptor D1 sobre la liberación de GABA. Esta enzima ejerce una regulación sobre dicho complejo de receptores de tal forma que, al ser activada por influjos masivos de calcio, impide la señalización del dímero, presumiblemente a través de su interacción sobre el receptor D3, el cual es señalado como el responsable de conferir al receptor D1 mayor afinidad por su ligando. Interesantemente, la actividad del dímero D1-D3 en denervación dopaminérgica no es apreciable, de hecho la co-activación de ambos receptores produce un efecto antagónico por parte del receptor D3 sobre la actividad de D1, y este proceso es independiente de la actividad de la CaMKII.

El objetivo del presente trabajo fue establecer los procesos moleculares implicados en la regulación del dímero D1-D3 por parte de la CaMKII en condiciones normales y discernir si algunos de ellos se encuentran alterados en la denervación dopaminérgica.

A través de ensayos de co-inmunoprecipitación y Western Blot fue mostrado que, en condiciones normales, la despolarización induce una mayor interacción de la CaMKII con el receptor D3, lo que explica los efectos observados sobre la formación de AMPc y la liberación de neurotransmisor. Esta unión, a pesar de obstaculizar la señalización del dímero, no es capaz de producir su separación, como había sido hipotetizado.

Contrario a lo esperado, fue posible identificar la interacción D1-D3 en condiciones de denervación dopaminérgica, de manera que, posiblemente se encuentre incluso señalizando, pero sus efectos pueden verse ocluidos por la exacerbada señalización de los receptores D3 reportada en dicha condición patológica. Se encontró también que, al ser activada la CaMKII, esta es incapaz de interactuar de manera significativa con el receptor D3, que puede atribuirse a una alteración en la actividad de la cinasa o bien a una disminución en su expresión basal.

Los resultados de este trabajo permiten redondear el concepto de un dímero que había sido evaluado solo a nivel funcional, y representan en conjunto un mecanismo novedoso de regulación de receptores, más aún, a nivel de la liberación de GABA en el circuito de los ganglios basales, y que adquiere mayor relevancia por el hecho de presentar disfunciones en condiciones patológicas; por lo que puede constituir un blanco terapéutico para la acción de fármacos encaminados al tratamiento de los desórdenes del movimiento, principalmente la enfermedad de Párkinson.

ABSTRACT

Calcium–calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is a central component in synaptic transmission, through its four isoforms, α , β , γ and δ , regulates neuronal plasticity, and learning and memory processes. In nucleus accumbens neurons, the alpha isoform of this kinase, when activated, is capable of phosphorylating to dopamine D3 receptors in their third intracellular loop through a physical connection, such interaction leads to inhibition of the action of these receptors, which is critical for integration of signaling that leads to behavioral control.

Recently, evidence has shown a CaMKII influence on the activity of the heterodimer D1-D3 protein complex, that has been identified in presynaptic striato-nigral terminals, and whose association leads to a potentiation of the effects exerted by D1 receptor itself on GABA release. This enzyme has a regulation on the receptor complex such that, when activated by massive influx of calcium prevents dimer signaling, presumably through its interaction on D3 receptor, which is identified as responsible for conferring the higher affinity D1 receptor by its ligand. Interestingly, the activity of D1-D3 dimer in dopaminergic denervation is not noticeable, in fact co-activation of both receptors produced an antagonistic effect between D1 and D3 receptors, and this process is independent of the activity of the CaMKII.

The aim of this study was to establish the molecular processes involved in the regulation of D1-D3 dimer by CaMKII in normal conditions and discern if some of them are altered in dopaminergic denervation. Through co-immunoprecipitation assays and Western blotting was shown that in normal conditions, depolarization induces greater interaction of CaMKII with D3 receptor, which explains the observed effects on cAMP formation and release of neurotransmitter. This union, despite interferes dimer signaling is unable to produce its separation, as had been hypothesized.

Contrary to expectations, it was possible to identify D1-D3 complex in dopaminergic denervation conditions, so, even is possibly that dimer works, but its effects can be occluded by the exacerbated D3 receptor signaling reported in this pathological condition. It was also found that, when activated CaMKII, is unable to interact significantly with D3 receptor, which is attributable to an alteration in the activity of the kinase or to a decrease in basal expression of this protein.

The results of this study allow complete the concept of a dimer, and taken together represent a novel mechanism of receptor regulation, especially at the level of the release of GABA in the basal ganglia circuitry, and it becomes more important by the fact of presenting dysfunctions in pathological conditions, so it may be a therapeutic target for the action of drugs aimed at treating movement disorders, particularly Parkinson's disease.

1.- CONTROL MOTOR

El cerebro es el órgano mayor del sistema nervioso central y representa un centro de control para el resto del organismo. Existe una gran cantidad de procesos regulados por este sistema, uno de los de mayor importancia, debido a lo indispensable que resulta para la realización de una buena parte de las actividades de los individuos, es sin duda la generación del movimiento.

Para lograr la ejecución de cualquier movimiento, se necesita la interacción de las estructuras del sistema nervioso motor, las cuales están organizadas jerárquicamente de modo que comprenden tres niveles. El nivel más alto está representado por las áreas de asociación de la neocorteza y los ganglios basales, cuya función es la de plantear la meta del movimiento a realizar y que estrategia es la mejor para lograrlo. En el nivel medio se encuentran la corteza motora y el cerebelo, a los cuales concierne la función táctica, es decir, el control de las secuencias de las contracciones musculares, tanto en espacio y tiempo, de tal forma que pueda ejecutarse de manera precisa el objetivo estratégico.

Finalmente, en el nivel inferior, a la médula espinal y el tronco cerebral corresponde la función ejecutora: la activación de las motoneuronas e interneuronas genera un movimiento dirigido hacia un objetivo y se realiza cualquier ajuste necesario en la postura (Neuroscience: exploring the brain).

Como puede apreciarse en esta estructura jerárquica, aunque la orden para moverse o no depende de la corteza cerebral, si los movimientos dependieran solamente de su asociación directa con la médula espinal, estos serían muy torpes. Se precisa entonces de la participación del llamado sistema extra-piramidal para lograr una activación más fina de sistema ejecutor.

1.1 Sistema extra-piramidal

El sistema extra-piramidal está constituido por axones que descienden del encéfalo a la médula espinal emitiendo colaterales que inervan a neuronas de órganos y núcleos como el cerebelo y los ganglios basales, representa por lo tanto una vía indirecta.

1.1.1 Cerebelo

El cerebelo controla el tono muscular y, por lo tanto, la postura dinámica y la coordinación sensitivo-motora. Entre sus funciones se encuentran la coordinación del movimiento, el equilibrio, el tono muscular, el aprendizaje motor y la regulación de las características del movimiento de los diferentes grupos musculares que intervienen en la ejecución de un programa motor relativas a velocidad, dirección y magnitud.

1.1.2 Ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos que se encuentran en la base del encéfalo, debajo de los hemisferios cerebrales. Sus efectos sobre la médula espinal son indirectos. Al no tener conexión directa con ella precisan de la mediación de la corteza cerebral, pasando por el tálamo.

Tienen funciones concretas sobre el movimiento (circuito esquetomotor) tales como iniciación, velocidad, amplitud y selección: refuerzan un patrón y rechazan los no compatibles.

Los núcleos cerebrales que conforman los ganglios basales son: la porción dorsal del cuerpo estriado, localizado en el telencéfalo, conformado a su vez por los núcleos caudado y putamen; el globo pálido, situado también en el telencéfalo, en él se distinguen el segmento externo y el segmento interno; el núcleo subtalámico, en el diencefalo y finalmente la sustancia negra, ubicada en el mesencéfalo, de la cual se diferencian dos partes, una dorsal o compacta, y una ventral o reticulada (Figura 1).

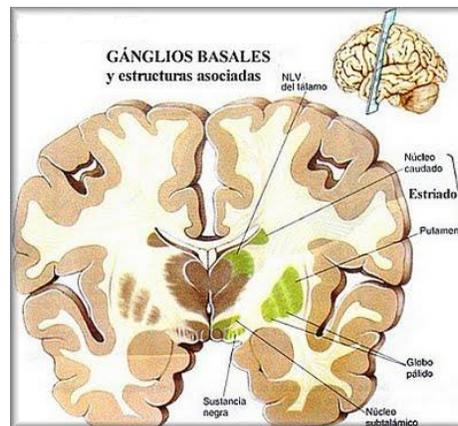


Figura 1. Los ganglios basales. Esquema que muestra la posición de los de los ganglios basales en el cerebro.

1.1.2.1 Núcleo estriado

Es el núcleo más grande de los ganglios basales, comprende el caudado, el putamen y el estriado ventral, incluyendo el núcleo accumbens. Esencialmente todas las áreas corticales –sensitiva, motora y asociativa- proyectan hacia el estriado (Bolam et al. 2000, Gerfen et al. 2002).

El otro input glutamatérgico hacia el estriado proviene del tálamo, particularmente del núcleo talámico intralaminar (Doig et al. 2010, Smith et al. 2004).

El estriado también recibe aferentes inhibitoras provenientes de colaterales de axones de las neuronas espinosas medianas de proyección y de interneuronas GABAérgicas. Otra aferente importante hacia el estriado es originada por neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta y del área ventral tegmental. Dicho núcleo recibe también aferentes serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe y una aferente dispersa noradrenérgica del locus coeruleus. Casi el 95% de la población de neuronas del estriado son neuronas espinosas medianas (MSN) de proyección que utilizan como neurotransmisor al GABA. Estas neuronas se dividen en dos subtipos de acuerdo a su contenido neuroquímico y el núcleo hacia el que proyectan. Por un lado, el primer subtipo proyecta hacia la porción reticulada de la sustancia nigra y expresa, además de GABA el péptido sustancia P/dinorfina. Por otra parte, el otro subtipo de MSN proyecta hacia el globo pálido externo y co-liberan GABA junto con los neuropéptidos denominados encefalinas. Adicionalmente el 5% de la población neuronal del estriado corresponde a interneuronas que expresan acetilcolina, somatostatina, diaforasa de NADPH o GABA asociado a parvalbúmina o calretina (Gerfen & Surmeier, 2011).

1.2.2.2 Núcleo subtalámico

Estructura que posee neuronas fusiformes piramidales de carácter glutamatérgico. Sus eferentes se dirigen principalmente hacia la sustancia nigra reticulada y al globo pálido interno. Otras eferentes del núcleo subtalámico se dirigen

hacia el globo pálido externo. La actividad de las neuronas subtalámicas está regulada principalmente por la inervación GABAérgica del globo pálido externo (Shink et al., 1996) y las proyecciones glutamatérgicas provenientes de múltiples áreas de la corteza (Maurice et al., 1998). Recibe también entrada dopaminérgica que procede de la sustancia nigra compacta (Hassani et al., 1997; Galván y Wichman, 2008; Blandini et al., 2000).

1.1.2.3 Globo pálido

Este núcleo es una estructura cuyas neuronas son de carácter GABAérgico; anatómicamente se divide en dos segmentos: el globo pálido externo (GPe) y el globo pálido interno (GPi).

Las neuronas de la porción externa proyectan hacia el núcleo subtalámico, mientras que el globo pálido interno envía eferencias hacia la sustancia nigra reticulada y los núcleos premotores del tálamo, en particular a los núcleos ventral anterior y ventral lateral que a su vez proyectan difusamente a la corteza (Smith y Bolam, 1989). Las aferencias GABAérgicas más importantes que recibe el globo pálido provienen del cuerpo estriado, asimismo recibe inervación glutamatérgica procedente del núcleo subtalámico y del núcleo parafascicular del tálamo (Kincaid et al., 1991; Mouroux et al., 1997). Adicionalmente, recibe aferencias de carácter dopaminérgico de las colaterales de la vía nigroestriatal (Lindvall y Jorklund, 1979; Debeir et al., 2005).

1.1.2.4 Sustancia nigra

Se extiende a largo de todo el mesencéfalo y la parte caudal del diencéfalo y se encuentra formada por dos estructuras: la sustancia nigra compacta y la sustancia nigra reticulada.

a) Sustancia nigra compacta (SNc)

Es una estructura densamente poblada cuyas neuronas sintetizan el neurotransmisor dopamina, y algo que las caracteriza es la presencia de neuromelanina, lo que les confiere un color oscuro, de ahí el nombre dado a este núcleo. Sus eferencias se dirigen a todos los ganglios basales, inclusive a la parte reticulada de la propia sustancia nigra.

Recibe entradas glutamatérgicas del núcleo subtalámico y del núcleo pedunculopontino, mientras que el núcleo estriado, el globo pálido y la porción reticulada de la sustancia nigra le envían aferentes GABAérgicas.

b) Sustancia nigra reticulada (SNr)

Esta estructura se compone principalmente de neuronas GABAérgicas y en ella se integra la información de salida hacia los núcleos premotores del tálamo; recibe proyecciones aferentes GABAérgicas procedentes del cuerpo estriado (vía estriado-nigral), el globo pálido externo y, en menor proporción, aferentes glutamatérgicas del núcleo subtalámico.

La sustancia nigra reticulada se caracteriza por poseer una baja densidad neuronal, las células se encuentran interespaciadas y esencialmente son neuronas de proyección. Aunque la mayoría de células de la SNr son GABAérgicas, ha sido reportada la presencia de neuronas dopaminérgicas y colinérgicas en este núcleo (Richards et al., 1997; González-Hernández y Rodríguez, 2000).

1.1.3 Organización funcional de los ganglios basales

Las estructuras que conforman los ganglios basales se encuentran interconectadas entre sí, de manera que forman un circuito neuronal que procesa la información proveniente de la corteza, donde el núcleo de entrada a este circuito es representado por el cuerpo estriado y la sustancia nigra reticulada en conjunto con el globo pálido interno representan los núcleos de salida de la información neuroquímica que recorre a través de este sistema de organización funcional.

Entre el núcleo de entrada y los de salida divergen dos diferentes vías de interconexión: la vía directa o estriado-nigral que se considera activadora del movimiento y consiste en proyecciones monosinápticas del estriado hacia el complejo SNr/GPi; y la vía indirecta, en la cual el cuerpo estriado se comunica hacia el globo pálido externo y este a su vez proyecta hacia el núcleo subtalámico, el cual envía eferencias hacia la SNr y GPi; el resultado de esta interacción es la inhibición del movimiento regulado por los ganglios basales. De los núcleos de salida, los cuales son de naturaleza GABAérgica, son enviadas proyecciones a los núcleos premotores del tálamo. Los núcleos talámicos después

proyectan eferentes glutamatérgicas hacia la corteza y de esta forma se cierra el circuito motor (Blandini et al, 2000).

Las distintas vías de proyección estriatales contribuyen diferencialmente a los circuitos excitatorios e inhibitorios que regulan los ganglios basales, resultando en efectos funcionalmente opuestos: la vía directa conduce a la desinhibición de los núcleos de salida, lo que implica una facilitación de movimiento; mientras que la indirecta conduce a su inhibición.

Por lo mencionado anteriormente puede apreciarse que la SNr, como núcleo de salida del circuito de los ganglios basales, desempeña un papel crítico en la transmisión de información motora hacia las áreas corticales, y que cualquier cambio de en la actividad neuronal de este núcleo tendrá implicación directa en el comportamiento motor.

Por lo tanto, las alteraciones de la descarga del complejo GPi/SNr dan lugar a la modificación del comportamiento motor, ya sea aumentándolo (hipercinesia) o disminuyéndolo (bradicinesia). De hecho, varios péptidos y neuromoduladores pueden influenciar la actividad neuronal de las células nigrales. De entre estos agentes moduladores uno de los que juega un rol central es el neurotransmisor dopamina, el cual, a través de distintos subtipos de receptores, distribuidos de manera diferencial en la vía directa e indirecta modula la actividad no solo de los núcleos de salida, sino de todas las estructuras participantes en el circuito de los ganglios basales, lo que será descrito con más detalle en el siguiente apartado.

2.- LA DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES

La dopamina es un neurotransmisor perteneciente a la familia de las catecolaminas, se sintetiza a partir del aminoácido tirosina (Figura 2) y es la molécula catecolaminérgica de mayor importancia en el sistema nervioso central pues participa en un gran número de funciones como la cognición, memoria, reforzamiento positivo, ingesta de alimento y la actividad locomotora, ejerciendo esta última a través de su acción sobre los ganglios basales (Neve et al., 2004).

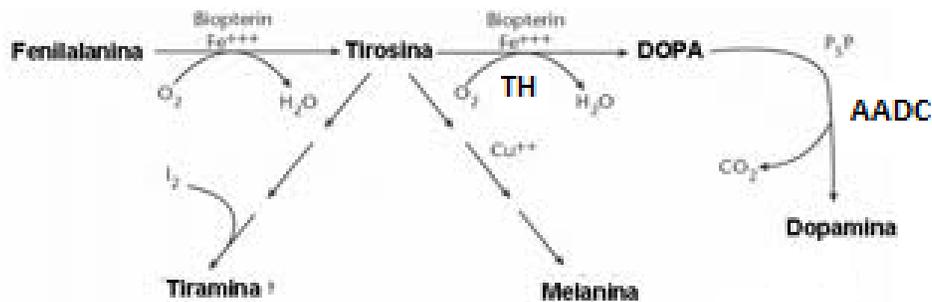


Figura 2. Síntesis de la dopamina. En la primera reacción la tirosina es convertida a DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), en presencia de tetrahydrobiopterina como cofactor. En la segunda reacción la DOPA es convertida a dopamina por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC).

Han sido descritos tres sistemas de innervación dopaminérgica en el sistema nervioso central. El primero de ellos es el núcleo denominado área ventral tegmental (AVT) el cual inerva al sistema límbico, núcleo accumbens y algunas áreas de la corteza, este sistema está involucrado en emociones, cognición y reforzamiento, principalmente; el segundo es el núcleo arqueado, que envía aferencias principalmente a la glándula pituitaria y que está involucrado en procesos endócrinos.

2.2 Localización de los receptores a dopamina en los ganglios basales

2.2.1 Receptores de la familia D1

Los subtipos de receptores que integran la familia de receptores tipo D1, tanto el receptor a dopamina D1 como el receptor D5, comparten un 80% de homología en sus dominios transmembranales, su tercera asa intracelular y el carboxilo terminal son similares en extensión, sin embargo difieren en su secuencia de aminoácidos (Missale, 1998). Se trata de receptores de siete pasas transmembranales acoplados a una proteína G_s , y su estimulación conlleva el aumento de la actividad de la enzima adenilato ciclasa, lo cual incrementa la concentración de AMPc, lo cual activa a su vez a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la PKA fosforila canales de calcio, aumentando su probabilidad de apertura, favoreciendo la propagación del potencial de acción y aumentando la actividad neuronal. La respuesta funcional como consecuencia de la activación de receptores D1 en los ganglios basales, es un aumento en la liberación de GABA (Florán, et al., 1990), proceso dependiente del influjo de calcio a la neurona, por activación de canales de calcio del tipo P/Q (Arias-Montaña et al., 2007).

Los receptores D1 se expresan de manera preferencial en la vía directa de los ganglios basales, en el soma y sobre terminales de la vía estriado-nigral (Bordet, 2000), mientras que la localización de los receptores D5 parece restringirse a hipocampo, núcleo subtalámico y núcleo lateral mamilar y parafascicular del tálamo.

2.2.2 Receptores de la familia D2

La familia de receptores a dopamina del tipo D2 está constituida por los subtipos D2, D3 y D4. Los subtipos D2 y D3 comparten una homología del 75% en cuanto a sus dominios transmembranales, mientras que los subtipos D2 y D4 solo comparten una homología del 53%. Los receptores D3 y D4 presentan algunas diferencias que se acentúan en la cola del COOH terminal (Nestler, 2001). El asa intracelular de los receptores a dopamina tipo D2 es muy larga, característica común de aquellos receptores que interactúan con proteínas Gi/o.

El resultado de la estimulación de estos receptores es una disminución en la formación de AMP cíclico, debido a que activan canales de potasio, lo que deriva en la inhibición de canales de calcio, que finalmente lleva a disminuir la actividad neuronal. La consecuencia de la activación de los receptores de la familia D2 en el circuito de los ganglios basales es la inhibición de la liberación de neurotransmisor.

La distribución de los receptores D2-like en las estructuras de los ganglios basales ha sido estudiada extensamente debido al papel de estos receptores en el control del movimiento y su relación con padecimientos tales como la enfermedad de Parkinson.

2.2.2.1 Receptores D2

El subtipo de receptores de dopamina D2 comprende dos isoformas, la isoforma “corta” (D2_{short}) de 414 aminoácidos y la “larga” (D2_{long}) con 29 aminoácidos más en la tercera asa intracelular.

Está distribuido ampliamente en el caudado putamen, en las terminales estriado-palidales, con un patrón que va de medial a lateral, es decir, que la porción lateral del estriado exhibe mayor población de receptores D2 con respecto a la porción medial (Joyce et al., 1985; Fisher et al., 1994). También ha sido reportada la presencia de los receptores D2 en neuronas del globo pálido externo y NST, así como en dendritas de la SNc (Missale, 1998).

2.2.2.2 Receptores D3

El receptor D3 posee la mayor afinidad por la dopamina, $K_i = 30\text{nM}$ (Sokoloff et al, 1992) 1995). Al menos siete distintas variantes de splicing alternativo del receptor D3 han sido identificadas (Figura 4). Se conoce al receptor D3 de secuencia completa (denominado simplemente como D3) y una isoforma más corta, descrita como D3S, la cual carece de 21 aminoácidos en la tercera asa citoplasmática (Fishburn et al, 1993). Tanto el receptor D3 como el D3S exhiben alta afinidad por la dopamina. Han sido descritas otras cinco isoformas, las cuales no son capaces de unir dopamina y carecen de anclaje a la membrana plasmática, por lo que su función se cree estar restringida a la regulación de las dos isoformas más importantes (Snyder et al, 1991).

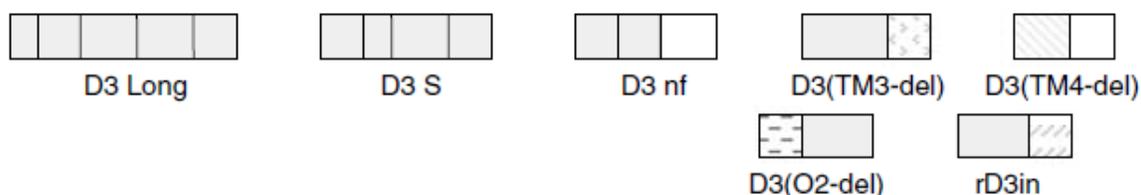


Figura 4. Esquema que muestra las distintas isoformas del receptor D₃

Los receptores D3 se encuentran expresados de manera abundante en el núcleo accumbens, islas de Calleja, área ventral tegmental (AVT), además de la SNc y GPi. Sin embargo, ha sido evidenciada la presencia de RNAm para el receptor D3 en el putamen (Surmeier et al., 1996), no obstante, la expresión del receptor sólo ha sido reportada en la SNr (Gurevich, 1999), lo cual sugiere que estos receptores son sintetizados en el soma de neuronas estriatales y son enviados hacia la SNr, donde se ubican de manera presináptica.

2.2.2.3 Receptores D4

La expresión de los receptores D4 en el cerebro es baja, localizándose en áreas como la corteza frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, globo pálido, SNr y tálamo (Beaulieu, JM., 2011; Defagot et al., 1997; Mrzljak et al., 1996).

Está demostrado que los receptores D4 también se expresan a nivel presináptico en la SNr, a nivel de las aferentes palidales (Acosta-García et al., 2009), regulando la liberación de GABA y la actividad locomotora (Erlj et al., 2012).

2.3 Interacciones proteína- proteína de los receptores dopaminérgicos

El concepto de que los receptores acoplados a proteínas G pueden existir como complejos homoméricos o heteroméricos ha sido bien establecido en los últimos años debido a la gran cantidad de evidencia encontrada sobre su interacción física con otros receptores, canales iónicos e incluso proteínas del citoesqueleto. Como parte de la superfamilia de GPCR's, los receptores a dopamina no están exentos de este fenómeno.

Se ha mostrado que los receptores D2 pueden formar homodímeros D2-D2 (Rocheville et al., 2000) o bien heterodímeros D2-D3 (Rocheville et al., 2000). Ha sido reportado también que tales receptores pueden interactuar con los receptores AMPA kainato (Zou et al., 20005). Los receptores D2 también pueden formar heterómeros con proteínas del citoesqueleto, como la proteínas 4.1 (Binda et al., 2002), la filamina A (Lin et al., 2001) y la proteína de unión a PP1 llamada espinofilina (Greengard et al., 1999).

La única interacción que se ha demostrado para el receptor D5 es la que forma, por medio de su carboxilo terminal, con el receptor GABA_A, donde la activación de dichos receptores dopaminérgicos es capaz de inhibir las corrientes GABAérgicas.

Con respecto a los receptores D1 se ha reportado que estos pueden interactuar con la subunidad NR1 el receptor NMDA, induciendo la activación de la vía de señalización de PI3K, con lo cual se activan vías antiapoptóticas y de sobrevivencia celular (Lee and Lui, 2004). También ha sido mostrado que la parte final del carboxilo terminal de los receptores D1 interactúa con la subunidad NR2A (Lee et al., 2002). El heterodímero conformado por el receptor D1 y el receptor A1 tiene como huella bioquímica que la activación de los receptores a adenosina disminuye el estado de alta afinidad de los receptores dopaminérgicos D1.

Una de las interacciones más estudiadas recientemente es la dada entre los receptores D1 y D2 (Figura 5) los cuales, cambian radicalmente el acople de sus proteínas G, G_s y G_i respectivamente, para incorporar una proteína G_q y activar la vía PLC-IP3 para generar incrementos en el calcio intracelular, lo que activa a su vez otras vías de señalización (Rashid et al., 2007).

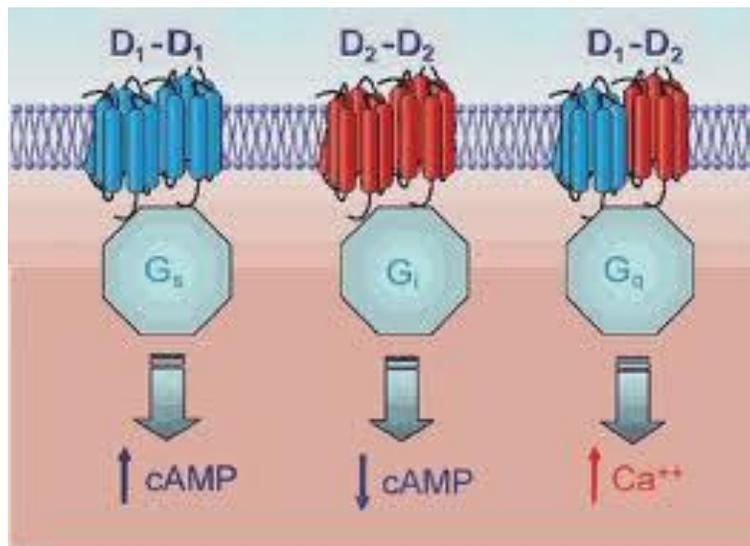


Figura 5. Los complejos de receptores a dopamina desencadenan diferentes cascadas de señalización. La estimulación del dímero D1-D2 (derecha) provoca un incremento súbito de calcio, haciendo a las neuronas sean más propensas a disparar de nuevo y consecuentemente forjando nuevas conexiones neurales.

En el siguiente apartado serán remarcadas un par de interacciones proteicas las cuales involucran a receptores dopaminérgicos, de la cuales no se tenía mucha evidencia y cuyo conocimiento es de particular interés pues es parte medular para el desarrollo de este trabajo.

3.- INTERACCIÓN HETERODIMÉRICA DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1-D3.

En 1996, Surmeier y colaboradores mostraron que un porcentaje importante de receptores D3, cuya ubicación había sido considerada exclusiva de neuronas de la vía indirecta en los ganglios basales, se encontraba expresado junto con el receptor D1, en neuronas estriatales que expresaban SP y dinorfinas. Reportes posteriores de estudios de microscopía confocal y de transferencia de energía (FRET y BRET) en sistemas de expresión heteróloga (Marcellino, 2008; Figura 6) sugirieron que ambos receptores, D1 y D3, podían estar formando una estructura dimérica. Más aún, empleando anticuerpos selectivos, fue encontrado que los receptores a dopamina D1 y D3 co-inmunoprecipitan en neuronas estriatales (Fiorentini, 2008; Figura 6). Estudios de binding en células transfectadas mostraron una característica única de la activación D1-D3: la estimulación del receptor D3 incrementa la afinidad del receptor D1 tanto por la dopamina, como por agonistas selectivos. Marcellino y colaboradores detectaron esta misma huella bioquímica en preparaciones membranales del núcleo estriado y que el efecto de la co-activación de estos receptores es tal que puede observarse a nivel conductual (Figura 6), evidenciando fuertemente su interacción como estructura heterodimérica.

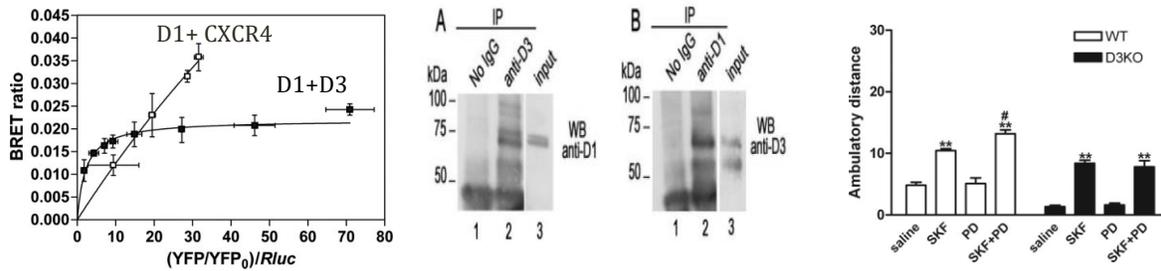


Figura 6. Huella bioquímica del dímero D₁-D₃. (Izquierda) Estudio de transferencia de energía en células HEK-293, los círculos negros representan la transferencia de energía que resulta de la co-transfección de los receptores D₁ y D₃. (Centro) Co-inmunoprecipitación de los receptores a dopamina D₁ y D₃ en estriado de rata, A, inmunoprecipitación D₃R y western Blot contra D₁R; B, inmunoprecipitación D₁R y western Blot contra D₃R. (Derecha) Implicación conductual de la interacción D₁-D₃ en ratones reserpinados wild type y knock- out del receptor D₃.

3.1 Implicaciones transduccionales de la heteromerización D1-D3

Es ampliamente aceptado que el receptor D1 señala a través de proteínas G_s / G_{olf}, activando por tanto a la enzima adenilato ciclasa (AC), mientras que el receptor D3 preferencialmente interactúa con proteínas G_i/G_o, inhibiendo la formación de AMPc. La heteromerización D1-D3 sin embargo, resulta en la potenciación de la estimulación de AC mediada por receptores D1 (Marcellino, 2008), donde la activación de los receptores D3 es requerida para potenciar los efectos del D1. Por lo tanto una de las funciones de la dimerización entre ambos receptores es permitir un mayor acople del receptor D1 al sistema de AMPc (Figura 7).

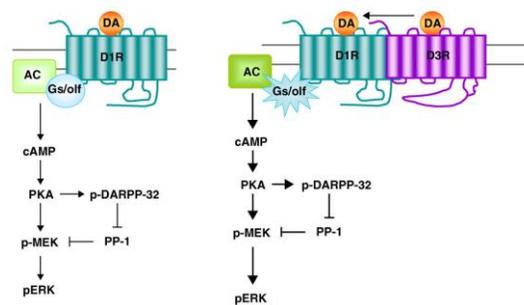


Figura 7. Diagrama esquemático que ilustra que la co- activación D1-D3 potencia los efectos en la vía de señalización del receptor D1.

Las respuestas adaptativas de los receptores D1 y D3 a la estimulación por agonistas son también modificadas por la heterodimerización. La fosforilación mediada por cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK's), la unión con arrestina y la posterior internalización es el mecanismo más común para terminar la señalización de los GPCR's y promover su reciclaje de la membrana plasmática, calibrando dinámicamente la disponibilidad de receptores en función de los ligandos extracelulares.

Los receptores D1 y D3 se caracterizan por poseer mecanismos de desensibilización diferentes. El receptor D1 sufre secuestro citoplasmático inducido por agonista y rápidamente es retirado de la membrana plasmática.

Por otra parte, la prolongada estimulación de los receptores D3 deriva en la disminución de su acople a sus proteínas G, con internalización parcial. La heteromerización modifica también la plasticidad adaptativa de ambos receptores.

En particular, la internalización inducida por agonista del D1R es evitada debido a su interacción con el D3R; mientras que, la co-activación promueve la internalización del complejo D1-D3 (Fiorentini, 2008). Este fenómeno puede representar un mecanismo neuronal para preservar la fuerza sináptica óptima durante la administración de drogas dirigidas al receptor dopaminérgico D1.

3.2 Implicaciones conductuales de la heteromerización D1-D3

El papel del D3R en la regulación de la actividad locomotora ha sido controversial debido a su localización en zonas pre-sinápticas y post-sinápticas.

Generalmente es aceptado que dosis bajas de agonistas D3 activan preferencialmente los auto-receptores D3 llevando a una depresión de la actividad motora, en cambio altas dosis de agonista conlleva a una activación motora, posiblemente relacionada a la activación de los D2R post-sinápticos. Sin embargo, ha sido reportada evidencia clara del papel post- sináptico del receptor D3 en el control de la conducta motora. En este estudio, usando la depleción de dopamina por medio de reserpina como herramienta para aislar mecanismos post-sinápticos, fue mostrado que la estimulación de los receptores D3 resulta en la potenciación de la actividad locomotora mediada por D1, y que esta respuesta fue abolida por el uso de antagonistas selectivos de D3R e incluso indetectable en ratones con knock out de dicho receptor. En base a estos hallazgos, en dicho trabajo se hipotetiza que este sinergismo conductual ocurre en las neuronas GABAérgicas que expresan sustancia P, es decir, en la vía directa de los ganglios basales.

4. ANTECEDENTES INMEDIATOS

4.1 El heterodímero D1-D3 en las terminales estriado nigrales

Debido al hecho de que el RNAm del receptor D3 ha sido localizado en el núcleo estriado (Surmeier, 1996), más no así la expresión de su proteína, se ha planteado la hipótesis de que el receptor es sintetizado en el soma y transportado hacia las terminales que comunican con la sustancia nigra (Gurevich, 1999), núcleo en el cual si ha sido encontrado el receptor.

Avalos- Fuentes en 2008 evaluó la funcionalidad de la estructura dimérica D1-D3 en las terminales estriado nigrales a diversos niveles de su vía de señalización. Experimentos realizados en sinaptosomas de la sustancia nigra mostraron que la activación del receptor D3 potenció los efectos del receptor D1 en la formación de AMPc y que el complejo de receptores señaliza a través de la vía AMPc-PKA, activando a canales de calcio de tipo L (Figura 8).

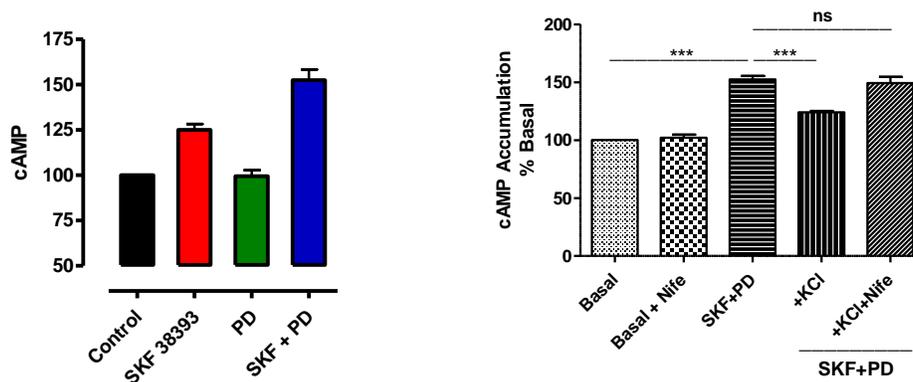


Figura 8. La activación del receptor D3 potenció los efectos del receptor D1 sobre la formación de AMPc (Izquierda). Los efectos del dímero D1-D3 son llevados a cabo a través de la activación de canales de tipo L, evidenciado por el efecto del nifedipino sobre la formación de AMPc mediada por el complejo de receptores (Derecha).

Sin embargo, interesantemente, al ser evaluada la liberación de neurotransmisor en rebanadas de la sustancia nigra, la activación de los receptores a dopamina D3 no tuvo efecto alguno sobre la liberación de GABA mediada por el receptor D1.

Este fenómeno se atribuyó a un factor inherente al receptor D3, pues el receptor D1 si señalizaba adecuadamente por si solo.

En dicho trabajo fue evidenciada la participación del calcio en la regulación de la señalización del heterodímero D1-D3, pues los experimentos de liberación de GABA radiactivo precisan la generación de un estímulo despolarizante, que deriva en un influjo masivo de calcio a la terminal, lo cual aparentemente estaba impidiendo observar la huella bioquímica del complejo de receptores.

Analizando la estructura del receptor D3 debe tomarse en cuenta que, como es característico de los receptores de la familia D2, posee una tercera asa citoplasmática de gran tamaño, lo cual, según diversos reportes hacen al receptor D3 un blanco ideal para la interacción con proteínas sub-membranales, estas interacciones han mostrado ser críticas en el control de la expresión del receptor en la membrana, así como en la eficacia de su señalización.

Como miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G, el D3R puede ser sujeto a modulación por fosforilación mediada por cinasas de proteínas en sus dominios citoplasmáticos.

De hecho la cinasa 4 de receptores acoplados a proteínas G (GRK-4) interactúa con el receptor dopaminérgico, fosforilándolo y regulando la eficacia de su señalización.

Previamente, Liu y colaboradores en 2009 habían identificado en el núcleo accumbens un nuevo modelo de regulación sináptica del receptor D3 a través de un mecanismo de asociación directa, que involucraba fosforilación mediada por una cinasa activada por calcio: la cinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CaMKII). La CaMKII es una proteína cinasa de serina y treonina, encontrada esencialmente en todos los compartimentos neuronales, presenta cuatro isoformas α , β , γ y δ de las cuales la isoforma alfa es la más abundante y cuyas funciones han sido estudiadas más ampliamente. Representa aproximadamente el 1% del contenido proteico total de las neuronas y se localiza preferentemente en las sinapsis. La unión de calcio y calmodulina al dominio regulatorio de la CaMKII revierte su autoinhibición, conduciendo a su activación.

La CaMKII activada exhibe una marcada afinidad por el receptor D3 y a través de una autofosforilación en la treonina 286 es capaz de seguir actuando de manera independiente a la presencia de calcio. Estudios de binding *in vivo* mostraron que la interacción entre CaMKII α y D3R sucede entre el dominio catalítico de la enzima y la región N-terminal de la tercera asa citoplasmática del receptor a dopamina en una secuencia motivo de 14 residuos (RILTRQNSQCISIR). Con base en lo anterior, el aumento en los niveles de calcio recluta la CaMKII a la tercera asa citoplasmática del receptor D3, esta es fosforilada en un sitio de serina específico, lo cual inhibe la disminución de la formación de AMPc mediada por D3R.

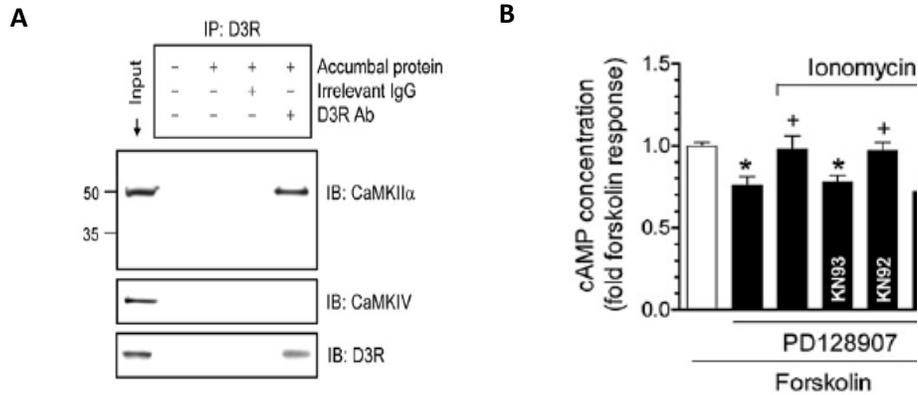


Figura 9. A, La CaMKII α inmunoprecipita con el receptor D3 en homogenados de núcleo accumbens. B, El influjo de calcio a las neuronas del Nac promueve la interacción CaMKII-D3, inhibiendo los efectos sobre la formación de AMPc mediados por el receptor dopaminérgico.

La interacción CaMKII-D3 por tanto parece ser un fenómeno que pudiera estar relacionado con el influjo de calcio y la regulación de la actividad del complejo D1-D3 en las terminales estriado nigrales sobre la liberación de GABA. Así fue evidenciado en experimentos de liberación de GABA radiactivo, donde, co-activando a los receptores D1 y D3 y empleando un inhibidor selectivo de la CaMKII pudieron observarse los efectos previamente descritos en la literatura del complejo D1-D3, lo que nos habla de la participación activa de esta cinasa, no solo en la regulación de la función de heterodímeros, sino también en regulación de la liberación de neurotransmisores.

Sin embargo el mecanismo exacto por el cual la cinasa bloquea la actividad del receptor D3 y sus efectos sobre el receptor D1 permanece sin ser esclarecido. Una interesante posibilidad a explorar es si la cinasa interactúa físicamente con el receptor D3 y si esto impide su dimerización con el receptor D1.

También de manera interesante este grupo de trabajo encontró que en la denervación dopaminérgica como la que ocurre en la enfermedad de Parkinson la relación funcional del dímero D1-D3 se modificaba, ya que la potenciación de receptor D₃ sobre la estimulación provocada por el receptor D1 se perdía, e incluso se tornaba antagónica, y mas aún no estaba regulada por la CaMKII. Esto también lleva a posibilidades interesantes para explicar estos fenómenos, uno puede ser la falta de dimerización D1-D3 en la denervación dopaminérgica por un lado y la interacción física de la cinasa con el receptor D3.

Estas especulaciones son objeto de nuestro trabajo y son de importancia no solo para la fisiología de los receptores a dopamina, sino para la terapéutica experimental basada en el uso de fármacos con acción selectiva sobre receptores a dopamina en la Enfermedad de Parkinson o para las complicaciones de las terapias actuales como son las discinesias inducidas por L-dopa.

5. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo por el cual la CaMKII regula la actividad del dímero D1-D3 en las terminales estriado nigrales se desconoce, por lo que se pretende dilucidar los procesos moleculares implicados en este fenómeno, tanto en condiciones normales como en denervación dopaminérgica.

6. HIPÓTESIS

La cinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CaMKII) evita la dimerización D1-D3 mediante su interacción física con el receptor D3 durante la despolarización, evitando su dimerización con el receptor D1, mientras que en condiciones de denervación este mecanismo no está presente.

7. OBJETIVO GENERAL

Proponer un mecanismo mediante el cual la CaMKII podría estar regulando la actividad del dímero D1-D3 en las terminales estriado nigrales de ratas hemiparkinsónicas.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la interacción de los receptores D1-D3, por medio de co-inmunoprecipitación, en condiciones normales y de Parkinson experimental, con y sin despolarización
- 2.- Evaluar el tipo de interacción de la CaMKII con el receptor D3 en el lado control y denervado de ratas hemiparkinsónicas, a través de coimmunoprecipitación, con y sin despolarización.
- 3.- Evaluar si la interacción de la CaMKII con el receptor D3 previene la formación del dímero D1-D3.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Para todos los estudios se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 210 a 230 gramos. Los animales fueron mantenidos en condiciones de habituación controladas en bioterio: temperatura de 18-23°C, ciclos luz-oscuridad 12:12 horas, alimentación y agua ad libitum. El uso y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por el comité de ética de la UPEAL del CINVESTAV.

Lesión unilateral con 6-hidroxidopamina

Con la finalidad de generar el modelo de Párkinson experimental, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina y Xilazina (112.5/22.5 mg/kg i.p.) y posteriormente colocadas en un aparato estereotáxico (Kopf, Tujunga, California, Estados Unidos de América). Fue localizado el punto bregma y se ubicaron las coordenadas correspondientes al haz del cerebro medio, obtenidas del atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson 1998 (antero-posterior, -1.8 mm; lateral, 2.4 mm y dorso-ventral, -7.0 mm), donde fue realizado un trépano con una fresa dental sobre el hueso temporal derecho. En dicho sitio fue efectuada la infusión de 1 μ l del neurotóxico 6-hidroxidopamina (16 μ g/ μ l, disuelta en ácido ascórbico al 0.1 %) a razón de 0.1 μ l/min en un periodo de diez minutos. Todas las ratas lesionadas fueron sujetas a un pre-tratamiento con imipramina (10 mg/kg i.p.) cuarenta y cinco minutos antes de la infusión de 6-hidroxidopamina, para proteger al sistema noradrenérgico de los efectos del neurotóxico.

Prueba conductual (conducta de giro)

Ocho días posteriores a la cirugía, se realizó la prueba conductual de giro para corroborar el grado de lesión dopaminérgica (Ungerstedt y Arbuthnott 1970).

La conducta de giro fue inducida mediante la inyección de anfetamina (10 mg/kg i.p.), todas aquellas ratas que realizaron ocho o más giros ipsilaterales (hacia el lado de la lesión) por minuto durante una sesión de una hora, fueron incluidas en los experimentos posteriores.

Obtención del tejido

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y rápidamente decapitadas, fue obtenido el cerebro que posteriormente fue fijado al fondo de una caja de Petri cubierta con Krebs- Hepes frío y previamente oxigenado en una mezcla O₂ y CO₂. La caja Petri, se sujetó a un vibratomo (CAMPDEN instruments ltd, USA) con el cual se obtuvieron rebanadas coronales de 300 micrómetros de espesor. Finalmente se realizó la disección de la sustancia nigra, separando a su vez el lado intacto del lado lesionado obtenido de las rebanadas.

Obtención de la fracción sinaptosomal

Las rebanadas de sustancia nigra fueron sometidas a homogeneización (10 golpes a velocidad de 400-500 rpm) en una solución HEPES-sacarosa (0.32M).

El homogenado fue centrifugado a 3750 rpm durante diez minutos a una temperatura de 4°C, separando de esta manera núcleos y mitocondrias de las membranas. El sobrenadante fue recuperado y posteriormente sometido a centrifugación a 15,000 rpm durante 40 minutos. Se recuperó la pastilla (P1) y fue resuspendida en el mismo buffer de sacarosa 0.32 M, la cual se colocó sobre una solución HEPES-sacarosa 0.8 M y centrifugada nuevamente a 15,000 rpm durante 40 minutos. La fracción sinaptosomal obtenida (P2) fue resuspendida en solución Krebs-Hepes y separada en alícuotas de 250 µl, a algunas de las cuales les fueron adicionados 10 µl de solución de KCl [275 mM], para inducir la actividad de la CaMKII. Después de transcurridos 10 minutos, las muestras fueron congeladas durante 15 minutos con la finalidad de detener las reacciones enzimáticas para finalmente ser resuspendidas las pastillas en RIPA en presencia de inhibidores de proteasas.

Ensayo de co-inmunoprecipitación

Una vez resuspendidos en RIPA, los sinaptosomas fueron sonicados tres veces y se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra por medio del método de Bradford. Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación se agregaron 500 µg de proteína total a un tubo conteniendo 2 µl del anticuerpo afín a la proteína de interés (CaMKII, D1R ó D3R), dejándose incubar durante cuatro horas y posteriormente fueron adicionados 30 µl de proteína A/G agarosa, dejándose agitar toda la noche a 4°C para permitir la formación de complejos antígeno- anticuerpo acoplados a la matriz de agarosa.

Los inmunoprecipitados se colectaron por centrifugación a 13 000 rpm durante cinco minutos a 4°C y lavándose cinco veces con 500 µl de regulador RIPA.

Electroforesis

Fueron adicionados 20 µl de buffer de muestra 4X, sin β-mercaptoetanol para muestras de co-inmunoprecipitación y 200 µl con dicho agente reductor para muestras de lisado total. Las muestras de lisado total se hirvieron durante 10 minutos y fueron aptas entonces para su corrida en geles de poliacrilamida, mientras que las de inmunoprecipitación fueron usadas directamente.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% para la separación de las proteínas en muestras sometidas a co-inmunoprecipitación y 10% para la detección de proteínas de los lisados totales. Las muestras fueron colocadas en carriles de gel concentrador, las proteínas corrieron en una cámara de electroforesis con buffer de corrida a 55 mA por aproximadamente una hora.

Transferencia

Posteriormente el gel fue transferido sobre una membrana de PVDF previamente hidratada con metanol, colocándose en sándwich, y puesto en una cámara de transferencia húmeda durante toda la noche. Terminado ese período la membrana con las proteínas transferidas se colocó en solución de bloqueo durante 6 horas.

Incubación con anticuerpos

Las membranas de PVDF fueron incubadas con los anticuerpos primarios obtenidos de Sta. Cruz Biotechnology.

El anticuerpo primario contra D1R fue utilizado 1:2000. El anticuerpo contra D3 fue usado a razón de 1:2000. Por su parte, el anticuerpo contra CaMKII fue utilizado a dilución 1:1000. En todos los casos los anticuerpos se dejaron incubar durante 12 horas. Transcurrido este lapso las membranas fueron lavadas con solución TBS-Tween 0.02 %. Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios (1:3000 α -rabbit, para D1R y D3R; 1:2000 α -mouse para CaMKII) durante un periodo de dos horas, con agitación constante a 4°C. Después de efectuar los lavados correspondientes, las membranas fueron teñidas con ECL-Prime (General Electric) y realizada una autorradiografía mediante el método de revelado Kodak. Las bandas resultantes fueron analizadas por densitometría mediante el empleo del software Kodak 1D, la densidad óptica se obtuvo de la siguiente relación:

$$\text{Densitometría Unidades Arbitrarias} = \frac{\text{Intensidad neta} - \text{Fondo}}{\text{Área en pixeles}}$$

Los datos fueron graficados con ayuda del software Graph Pad Prism versión 5, tomando la muestra no despolarizada como control, y expresando en porcentaje el cambio inducido por la despolarización tanto en condiciones normales, como en denervación.

Soluciones utilizadas

Krebs-HEPES: NaCl (115mM), KCl (15mM), MgSO₄ (1.18mM), KH₂PO₄ (1.18mM), CaCl₂ (1.8mM), HEPES (20mM), Glucosa (11mM) a pH de 7.4.

HEPES- Sacarosa (0.32M): HEPES (5mM) y sacarosa (0.32M) a pH de 7.4.

HEPES- Sacarosa (0.8M): HEPES (5mM) y sacarosa (0.8M) a pH de 7.4.

Solución para gel separador: Acrilamida 30%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10%, persulfato de amonio (PSA) 10%, tetra metil, etil-diamida (TEMED) 0.0004%.

Solución para gel concentrador: Acrilamida 30%, Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 10%, persulfato de amonio (PSA) 10%, TEMED 0.0001 %

Buffer de corrida: Tris- base (0.025M), Glicina (0.192M), SDS 0.1 % pH 8.3.

Buffer de transferencia: Tris-Base (50mM), Glicina (380 mM).

Buffer de muestra no desnaturizante: Tris-Base (325mM), SDS 10%, Glicerol 50%, azul de bromofenol 0.5%, pH 6.8.

Buffer de muestra desnaturizante: Tris-Base (325mM), SDS 10%, Glicerol 50%, 2-β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.5%, pH 6.8.

Solución de bloqueo: Leche libre de grasa 10%, TBS-Tween 0.02%.

TBS: NaCl (100mM), Tris-HCl (10mM), Tween 20 (0.2%) a pH 7.5.

RIPA: Tris-HCl (40mM), NaCl (150 mM), EDTA (2mM), glicerol (10%), Triton X-100 (1%), desoxicolato de sodio (0.5%), SDS (0.2%), pH 7.6.

10. RESULTADOS

Efecto de la despolarización en la estructura D1-D3 en el lado intacto de ratas hemiparkinsonicas

Se estudió en principio el efecto de un influjo masivo de calcio a las terminales estriado nigrales en el acople de los receptores D1 y D3, por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación. La primera estrategia experimental para lograr este objetivo fue realizar la inmunoprecipitación del receptor D1 y Western Blot para el receptor D3 a fin de coleccionar evidencia de su interacción. Como control para verificar la especificidad de la inmunoprecipitación y descartar posibles artefactos, se incluyó un control negativo consistente en una muestra de sinaptosomas con solo perlas de agarosa, omitiendo la presencia de un anticuerpo. El primer hallazgo que resulta interesante es la confirmación de la presencia de esta estructura dimérica en las terminales estriado nigrales, pues el Western Blot para el receptor D3 resulta positivo, es observada una banda situada en un peso molecular de ~ 50 KDa correspondiente con el peso del receptor. Cuando los sinaptosomas fueron expuestos a un estímulo despolarizante, generado por la incubación en una solución de cloruro de potasio al 15mM, esta no tuvo efecto en la estructura dimérica, pues se pudo apreciar una expresión equivalente de complejo D1-D3 en esta condición (Figura 10).

La cantidad de proteína cargada y por tanto la densidad de receptores D3 presentes en cada condición fue constante, así lo refleja el input, que representa el 10% del lisado total usado para la co-inmunoprecipitación.

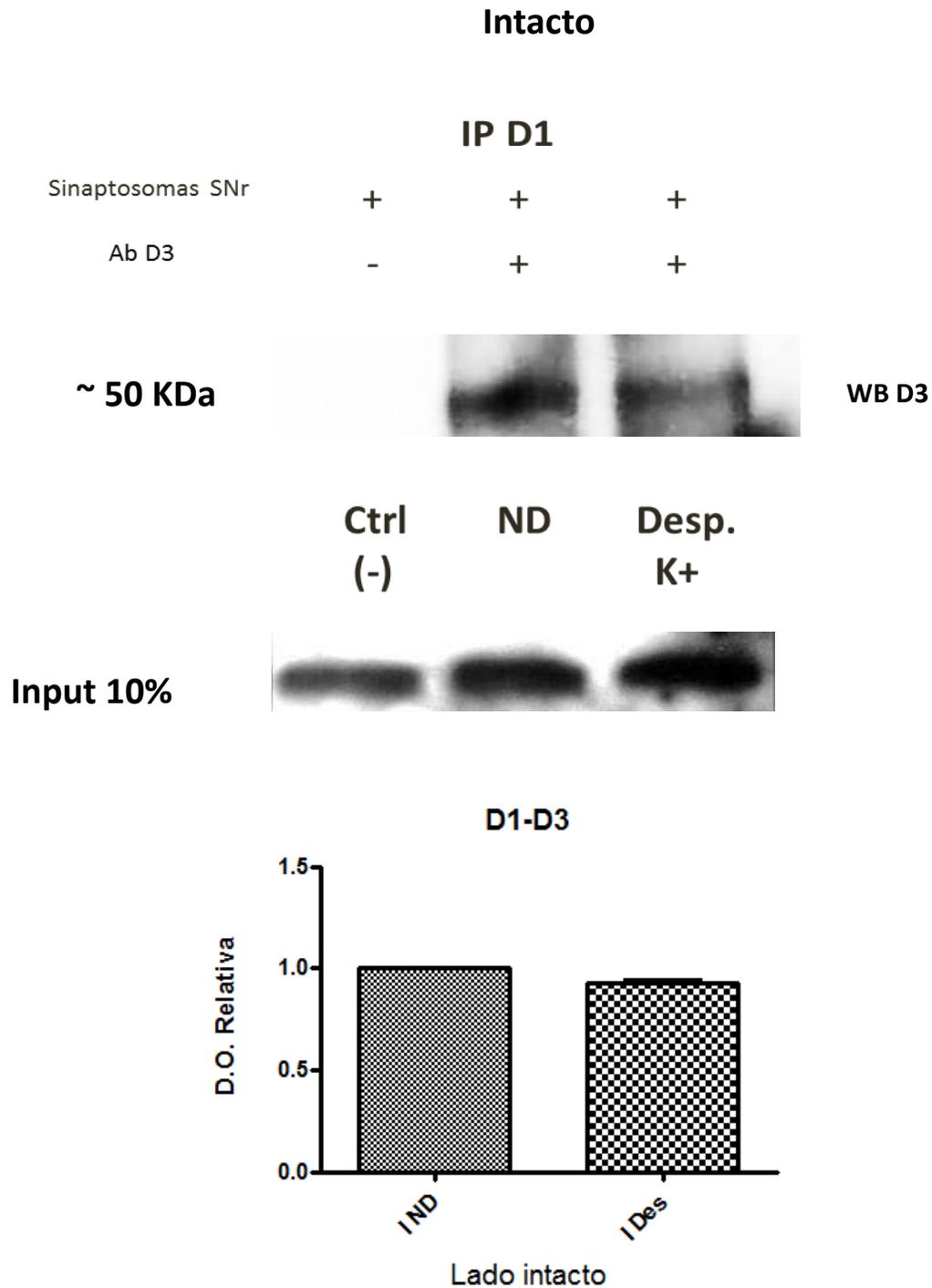


Figura 10. Inmunoprecipitación del receptor a dopamina **D1** y Western Blot contra el receptor **D3**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonicas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 50 kDa y corresponden al peso del receptor **D3** (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (*I ND*) se muestra la expresión normalizada del receptor **D3** y la banda a la derecha (*I Des*) muestra la expresión del receptor **D3** en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Para confirmar el resultado anterior se procedió a ejecutar la maniobra contraria, es decir, ahora se realizó la inmunoprecipitación del receptor D3 y el Western Blot para el receptor dopaminérgico D1 en muestras de lisados sinaptosomales provenientes de la sustancia nigra.

Los resultados obtenidos fueron similares y complementaron a los descritos anteriormente: por un lado se confirmó la ubicación del dímero D1-D3 a nivel de las terminales de la vía estriado nigral, pues fue observada la presencia una banda que aparece en ~ 70 KDa, correspondiente al peso molecular del receptor a dopamina D1. Por otra parte, se vuelve a mostrar que la exposición de las terminales a un influjo masivo de calcio, generado por la exposición de los sinaptosomas a una solución alta en potasio, no tiene efecto sobre la interacción del complejo de receptores D1-D3 (Figura 11).

La cantidad de muestra y por tanto la densidad de receptores D1 presentes en cada condición fue constante, así lo refleja el input, que representa el 10% del lisado total usado para la co-inmunoprecipitación.

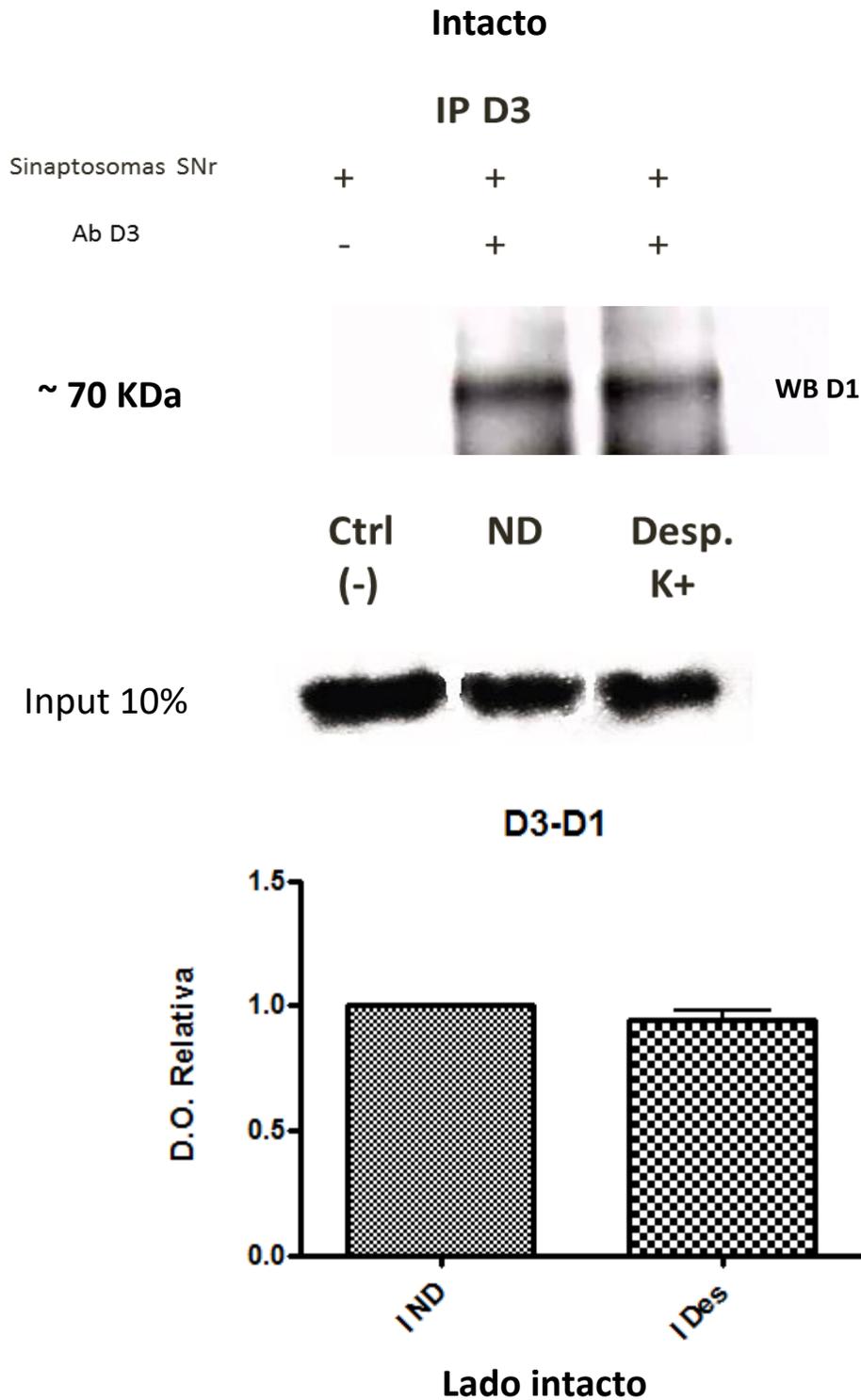


Figura 11. Inmunoprecipitación del receptor a dopamina **D3** y Western Blot contra el receptor **D1**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonicas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 70 kDa y corresponden al peso del receptor **D1** (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (*I ND*) se muestra la expresión normalizada del receptor **D1** y la banda a la derecha (*I Des*) muestra la expresión del receptor **D1** en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Efecto de la despolarización en la interacción CaMKII-D3 en el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas

Fue evaluada la interacción de la cinasa dependiente de calcio y calmodulina II con el receptor a dopamina D3 y el efecto de la despolarización con alto potasio sobre esta asociación. Se procedió a realizar la inmunoprecipitación del receptor D3 y la detección de la CaMKII por medio de la técnica de Western Blot. Un hallazgo a remarcar es que la CaMKII mostró tener una interacción basal con dicho receptor dopaminérgico, pues aún en ausencia de un estímulo puede observarse una banda ubicada aproximadamente en 100 KDa, lo que corresponde a la suma del peso de ambas proteínas, esto debido a que los ensayos fueron realizados en condiciones no reductoras, en las que se preserva la unión de las proteínas (Figura 12).

Al ser aplicado un estímulo despolarizante con alto potasio pudo observarse que la interacción de la CaMKII y el receptor D3 se ve aumentada, pues es evidente que la banda resultante, situada también alrededor de los 100 KDa posee un tamaño mayor, comparada con la condición control, lo que es confirmado por el análisis densitométrico realizado, el cual muestra un aumento del 34% en la unión D3-CaMKII (Figura 12).

La uniformidad en la cantidad de proteína utilizada para los ensayos queda reflejada en el input, que representa el 10% del lisado total usado para la realización de los experimentos de co-inmunoprecipitación.

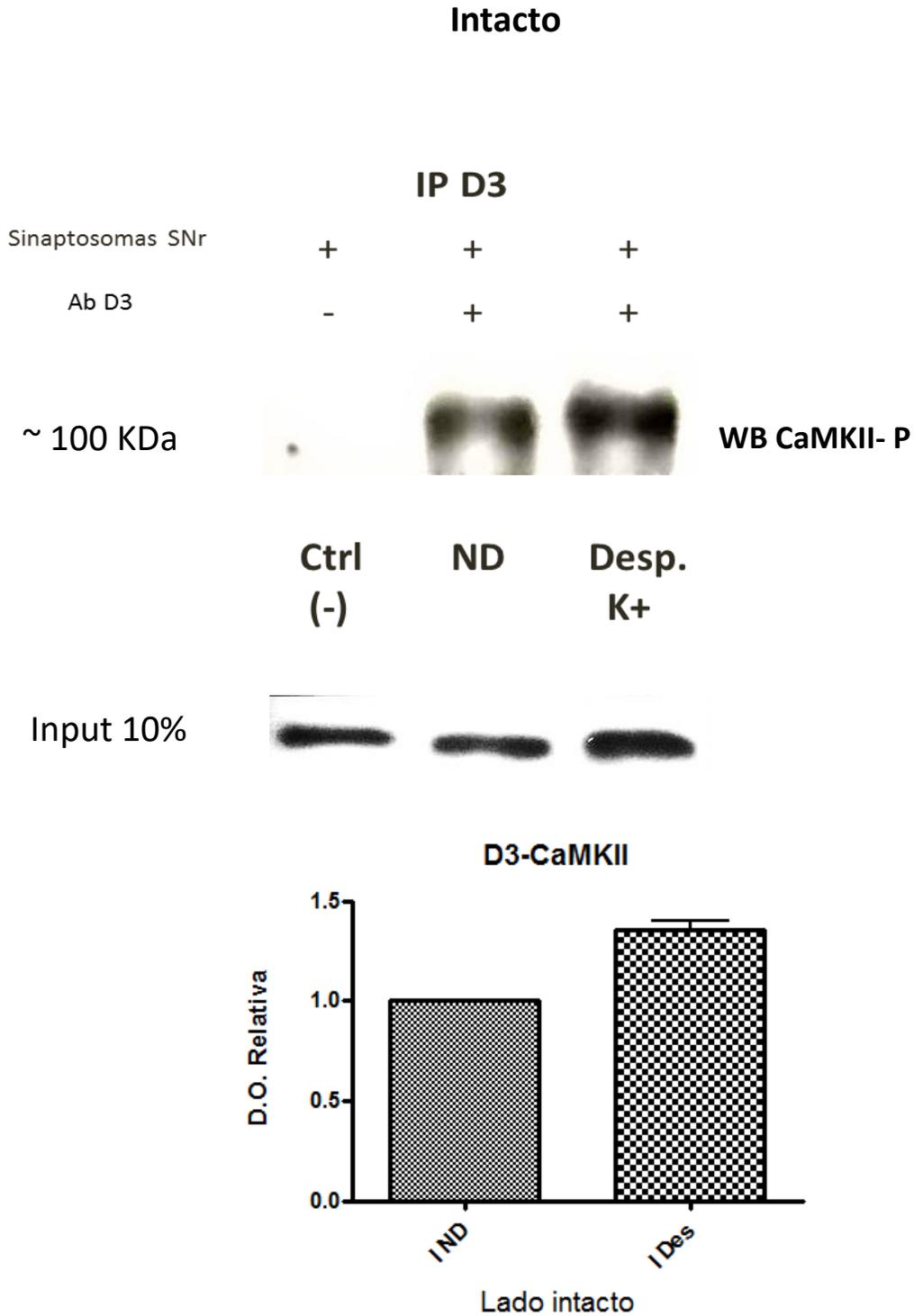


Figura 12. Inmunoprecipitación del receptor a dopamina **D3** y Western Blot contra **CaMKII-P**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonicas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 100 kDa y corresponden al peso sumado de ambas proteínas (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (*I ND*) se muestra la expresión normalizada de la **CaMKII-P** y la banda a la derecha (*I Des*) muestra la expresión de dicha cinasa en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Para corroborar los resultados observados en el experimento anterior fue realizada su maniobra inversa: la inmunoprecipitación de la CaMKII y el Western Blot contra el receptor a dopamina D3 en los lisados sinaptosomales obtenidos de la sustancia nigra.

Pudo apreciarse la interacción entre ambas proteínas aún en ausencia de estímulo, evidenciada por la detección de una banda correspondiente a un peso molecular de 100 KDa, el peso sumado de la CaMKII y el receptor D3.

Al inducir un estímulo despolarizante con cloruro de potasio se pudo apreciar un notable aumento en la interacción CaMKII-D3, lo cual fue confirmado por el análisis densitométrico de las bandas obtenidas, el cual revela un 33% de cambio en el lado despolarizado con respecto a la condición basal (Figura 13).

La uniformidad de la carga proteica quedó evidenciada por el input, que corresponde a un western Blot contra el receptor D3 y representa el 10% de la cantidad de lisado total utilizado para los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados.

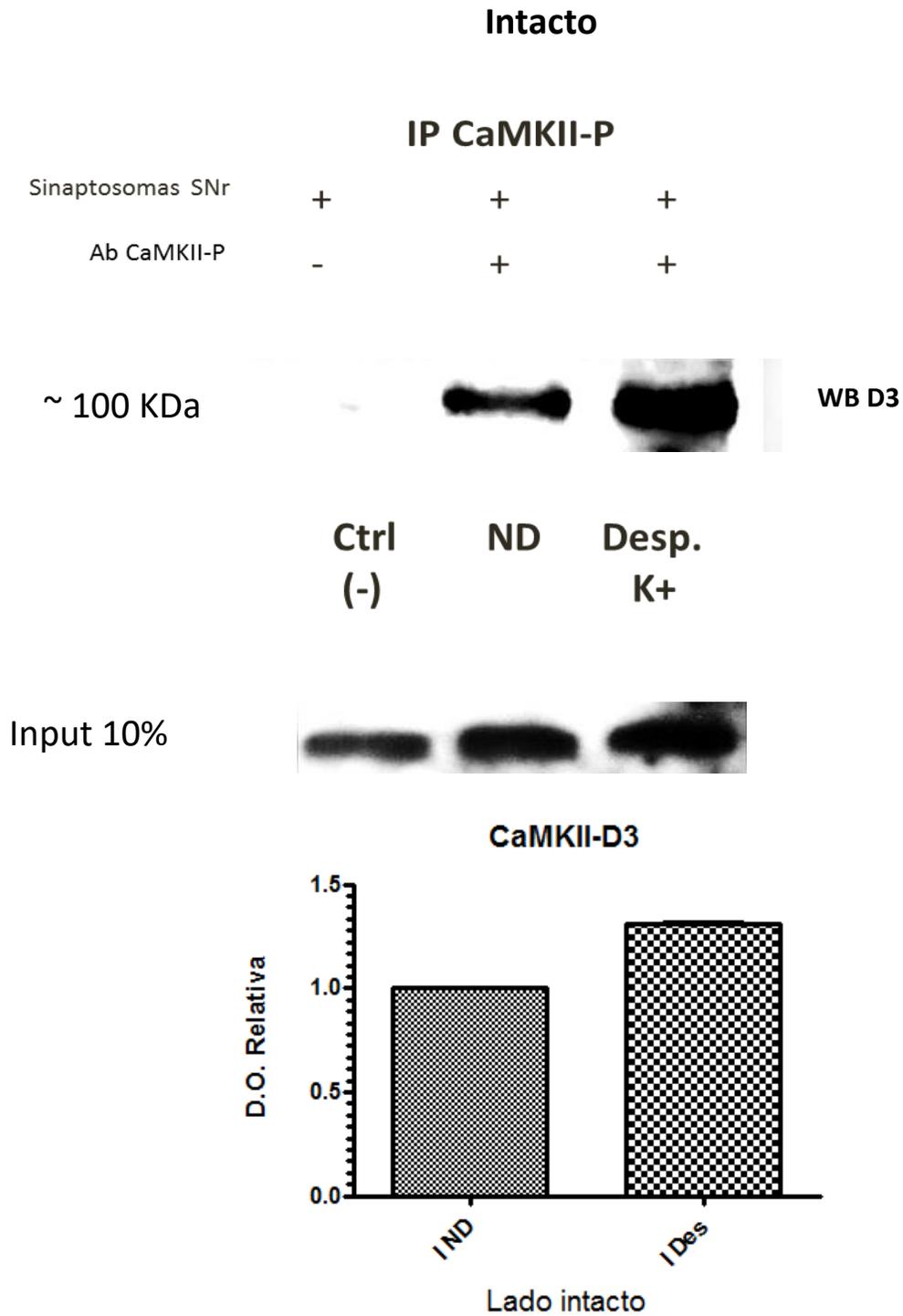


Figura 13. Inmunoprecipitación de **CaMKII-P** y Western Blot contra el receptor **D3**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonicas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 100 kDa y corresponden al peso sumado de ambas proteínas (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (*I ND*) se muestra la expresión normalizada del receptor **D3** y la banda a la derecha (*I Des*) muestra la expresión del receptor en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Efecto de la despolarización en la estructura D1-D3 en el lado denervado de ratas hemiparkinsónicas

Se evaluó el impacto de la denervación dopaminérgica sobre el acople de la estructura D1-D3, así como el efecto de la despolarización por alto potasio sobre la formación de este dímero.

Para este fin se realizó la inmunoprecipitación del receptor D₁ y el Western Blot para la detección del receptor D3. Contrario a lo hipotetizado, de manera interesante pudo apreciarse que el dímero D1-D3 se encuentra presente aún en lisados sinaptosomales provenientes de ratas hemiparkinsónicas, pues es detectada una banda en un aproximadamente 50 KDa, que corresponde al peso del receptor dopaminérgico D3.

Por otra parte, al aplicar un estímulo despolarizante a los sinaptosomas pudo apreciarse que esta no tiene efecto sobre la interacción basal del complejo de receptores D1-D3, así lo revela el análisis densitométrico realizado a las placas fotográficas obtenidas (Figura 13).

La uniformidad de la carga proteica quedó evidenciada por el input, que corresponde a un western Blot contra el receptor D3 y representa el 10% de la cantidad de lisado total utilizado para los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados.

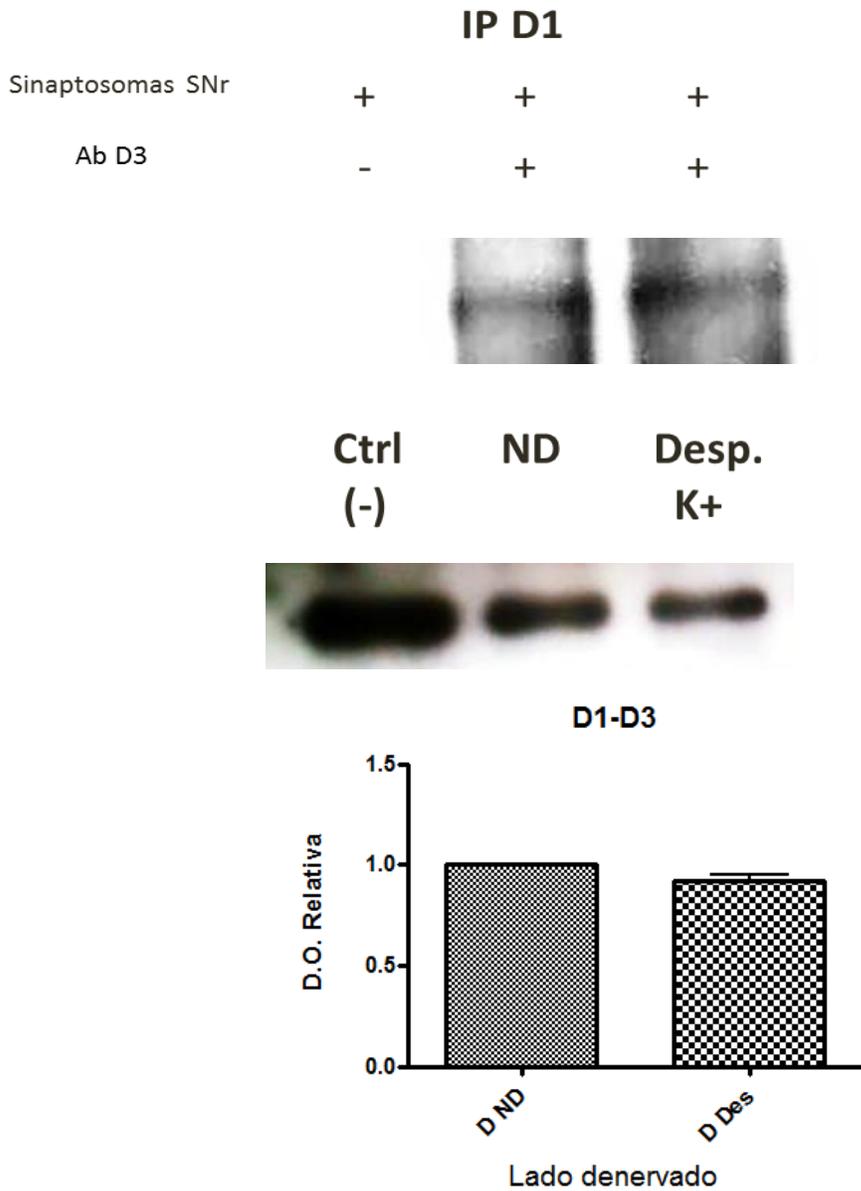


Figura 13. Inmunoprecipitación del receptor **D1** y Western Blot contra el receptor **D3**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonicas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 50 kDa y corresponden al peso del receptor **D3** (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (**D ND**) se muestra la expresión normalizada del receptor **D3** y la banda a la derecha (**D Des**) muestra la expresión del receptor en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Al realizar la maniobra contraria, es decir la inmunoprecipitación del receptor D3 y el western Blot contra el receptor D1 pudo darse confirmación al resultado anterior, esto es que el heterodímero D1-D3 se encuentra preservado aún en condiciones de denervación dopaminérgica, debido a la detección de bandas en un peso aproximado de 70 KDa, lo cual es correspondiente con el peso del receptor D1.

Conjuntamente fue observado que la despolarización, inducida por altas concentraciones de potasio no tiene un efecto apreciable sobre la interacción física de los receptores D1 y D3, pues la banda observada en aproximadamente 70 KDa y que corresponde al receptor D1 no presentó diferencia en su densitometría comparado con la condición basal (Figura 14).

La uniformidad de la carga proteica quedó evidenciada por el input, que corresponde a un western Blot contra el receptor D1 y representa el 10% de la cantidad de lisado total utilizado para los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados.

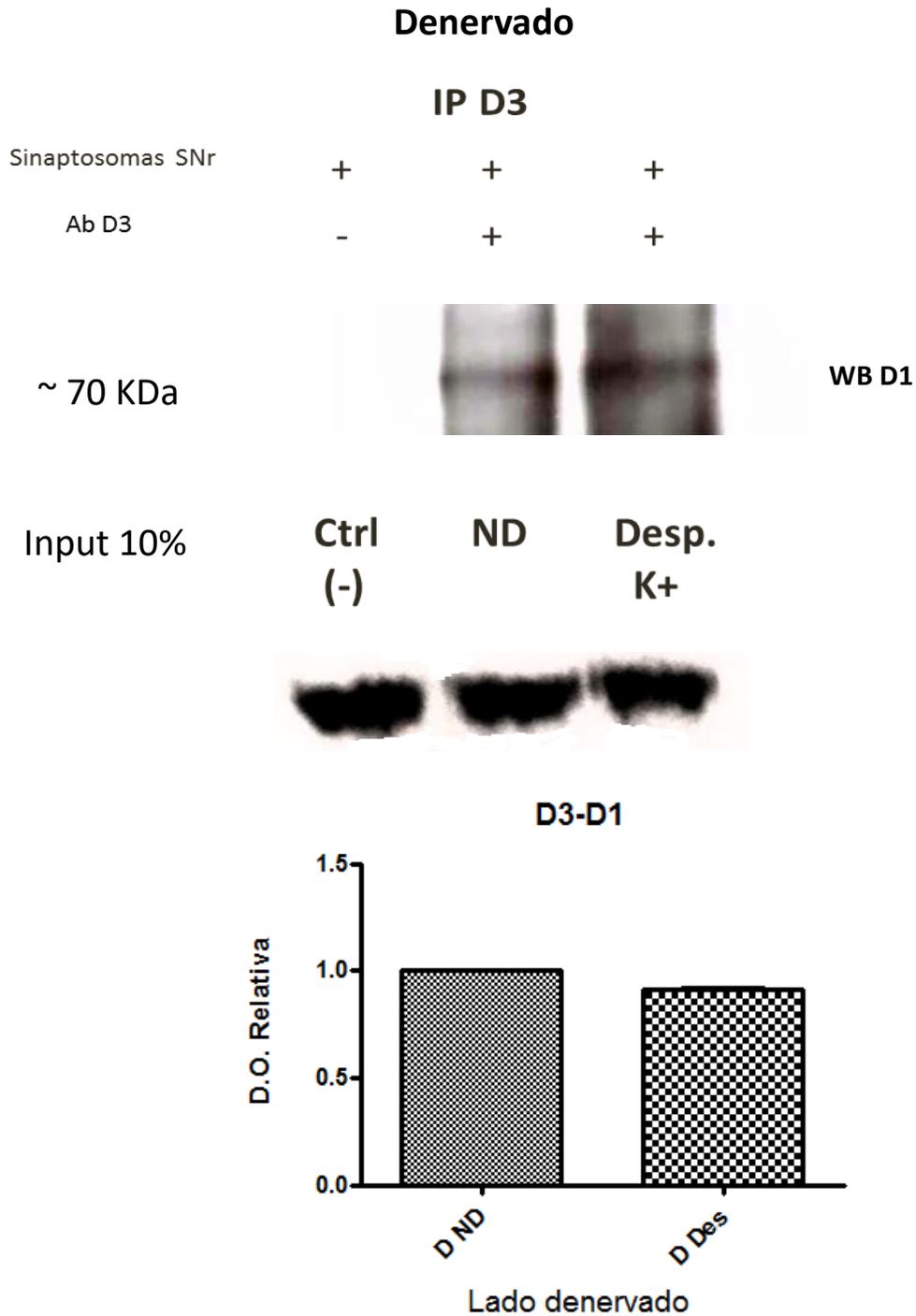


Figura 14. Inmunoprecipitación del receptor **D3** y Western Blot contra el receptor **D1**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonianas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 70 kDa y corresponden al peso del receptor **D1** (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (**D ND**) se muestra la expresión normalizada del receptor **D1** y la barra a la derecha (**D Des**) muestra la expresión del receptor en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Efecto de la despolarización en la interacción CaMKII-D3 en el lado denervado de ratas hemiparkinsónicas

Se evaluó la interacción de la CaMKII con el receptor a dopamina D3 en sinaptosomas del lado lesionado de ratas con denervación dopaminérgica, así como el efecto de la despolarización con alto potasio sobre esta asociación. Se procedió a realizar la inmunoprecipitación del receptor D3 y la detección de la CaMKII por medio de la técnica de Western Blot. Se puede observar la interacción basal de ambas entidades aún en ausencia de un estímulo, pues se obtuvo una banda ubicada aproximadamente en 100 KDa, lo que corresponde a la suma del peso de ambas proteínas.

Al ser aplicado un estímulo despolarizante pudo observarse que la interacción basal entre la CaMKII y el receptor D3 no se ve modificada, pues resulta evidente que la banda obtenida, situada también alrededor de los 100 KDa posee un tamaño equiparable a la encontrada en condiciones no estimuladas, lo cual se confirma por el análisis densitométrico realizado (Figura 15).

La cantidad de proteína utilizada fue uniforme de acuerdo a los inputs, que representan el 10% del lisado total usado para la realización de los experimentos de co-inmunoprecipitación.

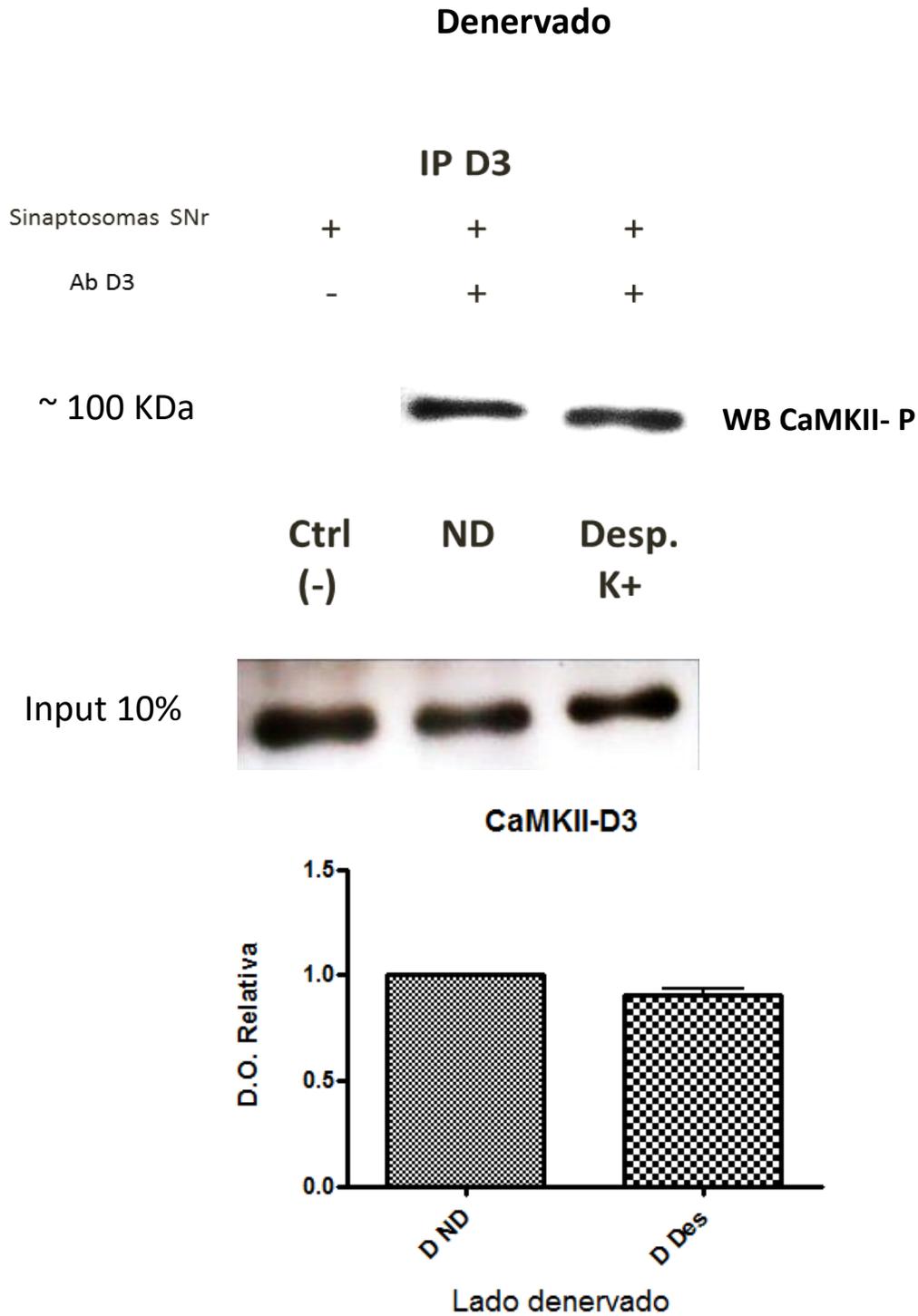


Figura 15. Inmunoprecipitación del receptor a dopamina **D3** y Western Blot contra **CaMKII-P**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonicas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 100 kDa y corresponden al peso sumado de ambas proteínas (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (**D ND**) se muestra la expresión normalizada de la **CaMKII-P** y la banda a la derecha (**D Des**) muestra la expresión de dicha cinasa en condiciones de despolarización (*Abajo*).

Se realizó la inmunoprecipitación de la CaMKII-P y la posterior detección del receptor a dopamina D3 por medio de Western Blot para corroborar la información obtenida de la maniobra anterior.

Por un lado se observó una interacción basal CaMKII-D3 en condiciones donde no había sido aplicado estímulo alguno. Se obtuvo una banda ubicada aproximadamente en 100 KDa, lo que es correspondiente al peso sumado de ambas proteínas.

De manera interesante, al generar un influjo de calcio a las terminales sinaptosomales por medio de su incubación con una solución alta en potasio, se obtuvo una banda en 100 KDa la cual no evidencia ninguna modificación en la interacción basal de las proteínas analizadas. Esto lo confirma el análisis densitométrico realizado a las imágenes de las bandas obtenidas gracias al Western Blot (Figura 16).

La uniformidad de la carga proteica quedó evidenciada por los inputs, que corresponden al western Blot contra el receptor D₃ y representan el 10% de la cantidad de lisado total utilizado para los ensayos de co-inmunoprecipitación que fueron realizados.

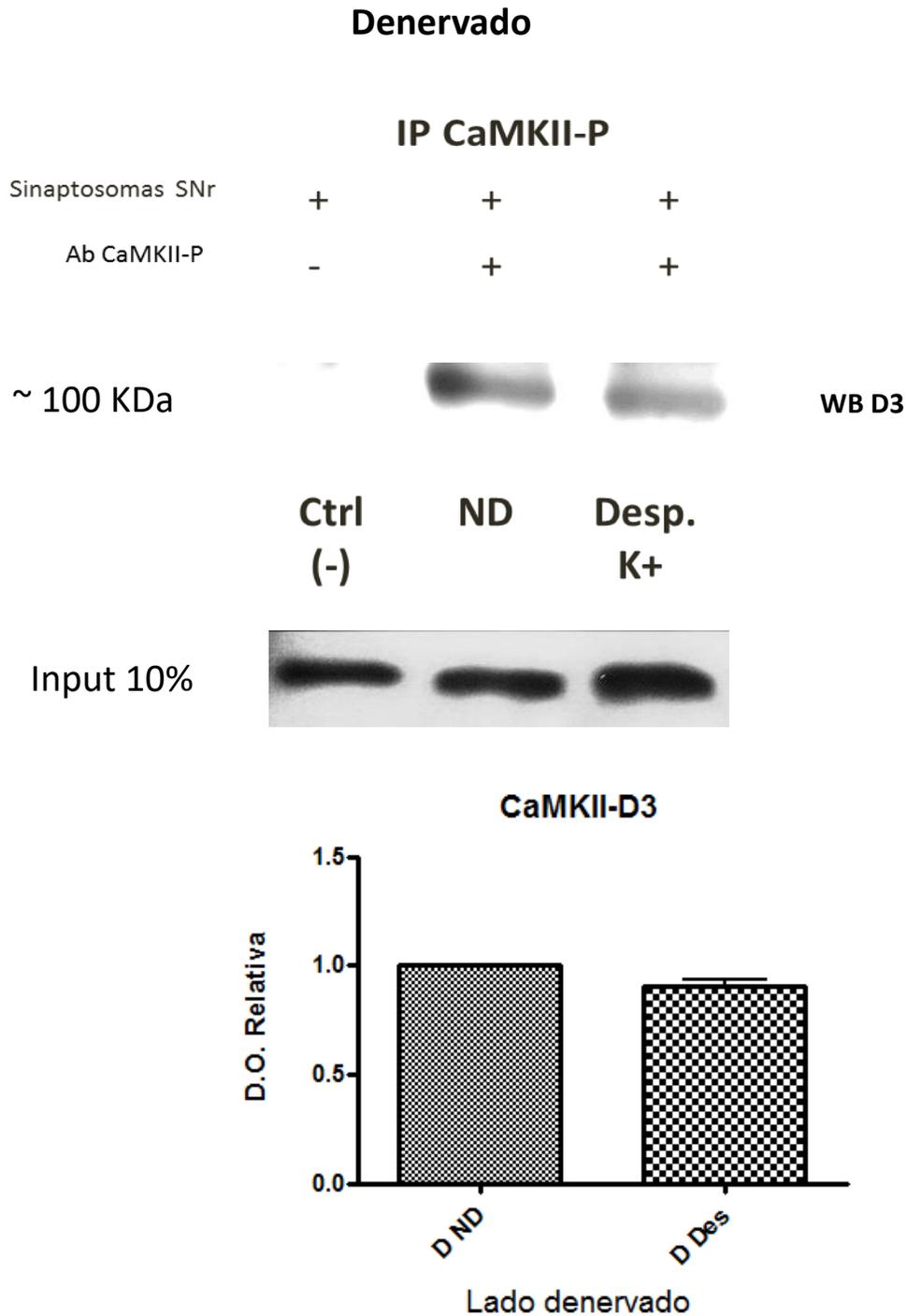


Figura 16. Inmunoprecipitación de la **CaMKII-P** y Western Blot contra el receptor a dopamina **D3**. Los ensayos fueron realizados en lisados sinaptosomales de ratas hemiparkinsonianas. Las bandas observadas se encuentran aproximadamente en 100 kDa y corresponden al peso sumado de ambas proteínas (*Arriba*). Se muestra el análisis densitométrico realizado, en la barra de la izquierda (**D ND**) se muestra la expresión normalizada del receptor **D3** y la banda a la derecha (**D Des**) muestra la expresión de dicha receptor en condiciones de despolarización (*Abajo*).

11. DISCUSIÓN

La heteromerización de los receptores acoplados a proteínas G es un concepto que ha adquirido fuerza gracias a la gran cantidad de evidencia que pone de manifiesto la importancia de la adaptación de los sistemas de señalización para llevar a cabo procesos fisiológicos cada vez más complejos. Uno de los aspectos más fascinantes de la dimerización de los GPCR's es que poseen distinta farmacología y función, comparados con los receptores expresados solo de manera individual.

Recientemente había sido demostrada la presencia del heterodímero D1-D3 en el circuito de los ganglios basales, de manera específica en las terminales estriado nigrales, donde tiene implicación en la liberación de GABA (Ávalos fuentes, 2008) y consecuentemente en el control motor (Marcellino, 2008). También se había colectado evidencia de que el influjo de calcio a la terminal estriado nigral, desencadenaba un mecanismo de regulación mediado por la CaMKII cuyo blanco directo era el receptor D3, impidiendo a este último potenciar los efectos del receptor D1 sobre la liberación de GABA. No obstante, los eventos moleculares involucrados en este mecanismo novedoso no habían sido dilucidados claramente.

En el presente trabajo fueron estudiados algunos de los procesos moleculares implicados en la regulación de la señalización del complejo D1-D3. Más aún, fueron evaluados estos mecanismos en un modelo de Párkinson experimental con la finalidad de encontrar la explicación de porque no es observable el efecto de esta estructura en dicha condición patológica.

Efecto de la despolarización en la interacción D1-D3.

El primer objetivo del presente estudio fue determinar el efecto molecular de la despolarización inducida por alto potasio en la señalización D1-D3. Debido a que la aplicación de un estímulo despolarizante impedía observar el efecto característico de este complejo de receptores, se especuló que posiblemente la interacción de la CaMKII con el receptor D3 podía inducir incluso el desacople del dímero y por ello no fueran apreciables sus efectos sobre función del receptor D1.

A través de experimentos de co-inmunoprecipitación en lisados sinaptosomales se obtuvo la primera evidencia molecular de la presencia del heterodímero D1-D3 en las terminales estriado nigrales, lo cual correlaciona con los experimentos llevados a cabo por Ávalos-Fuentes (Tesis de maestría, 2008), que había hecho evidente su existencia a nivel funcional y esclarecido buena parte de su vía de señalización.

Este hallazgo viene a redondear un concepto que ha venido tomado forma desde la postulación de que en la vía directa del circuito de los ganglios basales pueden expresarse también receptores dopaminérgicos de tipo inhibitorio y tiene relevancia por el hecho de presentarse como una explicación a fenómenos conductuales y fisiopatológicos que no estaban bien esclarecidos, pues se consideraba a los receptores dopaminérgicos como entidades individuales que se distribuían de manera rígida solo en una u otra vía de los ganglios basales.

Otro hallazgo interesante de este trabajo es que la despolarización inducida por alto potasio no tiene impacto en la inmunoprecipitación de ambas proteínas, sin embargo

debe tenerse cuidado con la interpretación de este resultado. Si bien indica que no es necesaria la internalización del receptor D3 o un alejamiento físico tan drástico para detener la señalización del complejo, es importante mencionar que el desacople de ambas estructuras pudo haber ocurrido a nivel de sus dominios citoplasmáticos, pues ha sido descrito que la CaMKII fosforilada se une a la tercera asa intracelular del receptor D3, específicamente en la serina 229 (Guo, 2010) y que es precisamente en esta localización subcelular donde ocurre la interacción con el carboxilo terminal del receptor D1 para formar la estructura dimérica, por lo que es posible hipotetizar que la cinasa puede impedir el acople adecuado de ambas estructuras a nivel intracelular, incluso formando un complejo heterotrimérico con ellos, sin que esto impida la detección de ambos receptores en una co-inmunoprecipitación.

Aún con este conocimiento resulta indispensable corroborar la migración de la CaMKII hacia la membrana plasmática para su posterior interacción con el receptor D3, por lo que deben realizarse los ensayos de co-inmunoprecipitación correspondientes en lisados obtenidos de fraccionamiento subcelular donde pueda garantizarse la manipulación de las membranas de las terminales estriado nigrales.

Resultaría interesante también evaluar el grado de proximidad de los receptores durante la despolarización a través de estudios de transferencia de energía tales como BRET o FRET.

Otra alternativa experimental que surge a partir de estos resultados es evaluar la posible formación de un complejo heterotrimérico D1-D3-CaMKII a través de ensayos de

co-inmunoprecipitación y Western Blot empleando anticuerpos específicos para cada una de estas proteínas.

Impacto de la denervación dopaminérgica en la interacción D1-D3

El sistema dopaminérgico de los ganglios basales es sujeto de importantes cambios plásticos y morfológicos cuando se encuentra expuesto a una condición patológica. Una de las más comunes e intrigantes es la enfermedad de Párkinson, que afecta la movilidad del individuo y que puede ser consecuencia de las múltiples modificaciones que sufre el sistema catecolaminérgico más importante en el control del movimiento.

Un hecho importante que ocurre en la enfermedad de Parkinson y en modelos de Parkinson experimental es la modificación de la población de receptores a dopamina y la sensibilización de su vía de señalización en respuesta a su activación (Cai et al., 2002; Gerfen et al., 2002), esto ha sido interpretado como un mecanismo compensatorio para sobrellevar la carencia de dopamina en el sistema. Así pues, en la denervación dopaminérgica se ha encontrado que los receptores de la familia D1 se encuentran disminuidos, en tanto que se ha mostrado consistentemente que existe un aumento de los de la familia D2 (Gerfen, 1990).

En base a estos conceptos, y a los estudios que sugieren que el dímero D1-D3 no es funcional durante el estadio patológico que representa la denervación dopaminérgica (Ávalos-Fuentes, 2008), resultó plausible plantear la hipótesis de que esta estructura se encontraba disminuida en el Párkinson experimental, más aún, que ambos receptores a dopamina ya no se encontraban interactuando entre sí.

Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación en sinaptosomas de la sustancia nigra de ratas lesionadas fue posible ensayar dicho planteamiento.

De manera muy interesante y opuesto a lo que se esperaba, fue posible detectar el complejo D1-D3 en el lado lesionado de ratas con Párkinson experimental. Para este fenómeno pueden proponerse varias alternativas que faciliten su explicación.

Sería lógico pensar que aunque el dímero esté presente en condiciones de denervación, quizá el acople a sus sistemas de señalización sea deficiente, sin embargo debe tomarse en cuenta que, la activación conjunta de los receptores D1 y D3, aunque antagonicos, si produjo efectos en la liberación de neurotransmisor, por lo tanto la funcionalidad de dichas entidades proteicas se encuentra preservada, por lo que se descarta esta posibilidad.

Otra opción es que, a pesar de que el dímero se encuentre preservado en la denervación e incluso este fuera capaz de encontrarse señalizando adecuadamente, sus efectos pudieran verse enmascarados por la acción de otros receptores que se encontraran sensibilizados, como ha sido descrito ampliamente en la depleción dopaminérgica.

De hecho, existe evidencia de que la vía de señalización los receptores D₃ se encuentra sobre-activada en el Párkinson experimental (Prieto et al, 2011) y que ocurre un desbalance entre la expresión estriatal del receptor D3 y su isoforma regulatoria D3nf, la cual se encuentra disminuida y por lo tanto es incapaz de regular adecuadamente la expresión del receptor D3 en la membrana, conduciendo en conjunto a generar una

respuesta funcional exacerbada. Por lo anterior, es posible proponer que la actividad inhibitoria incrementada de los receptores dopaminérgicos D3 en la denervación impida observar los efectos funcionales del heterodímero a pesar de encontrarse señalizando por su cuenta.

Sobre este respecto resultaría interesante confirmar si a nivel de las terminales estriado nigrales ocurre esta sobre-activación de los receptores D3. Dicho objetivo pretende abordarse a través de experimentos de electrofisiología mediante la cuantificación de las corrientes de calcio evocadas por agonistas selectivos de los receptores D3. Otro punto a evaluar sería verificar si la interacción D3-D3_{nf} se encuentra disminuida en la denervación, interacción que no ha sido evaluada hasta el momento en las sinapsis de la vía directa. De hecho, nuestro grupo de trabajo ha planteado ya estos objetivos a corto plazo para generar una explicación mas completa de lo que sucede con la interacción D1-D3 en la denervación dopaminérgica.

Efecto de la despolarización en la interacción CaMKII-D3

Los receptores de la familia D2 pueden interactuar con una gran variedad de proteínas, debido a que poseen una tercera asa intracelular particularmente prominente. El receptor dopaminérgico D3 no es la excepción y se conocen varias interacciones con proteínas que regulan principalmente su función y disponibilidad en la membrana plasmática.

En estudios previos había sido observado que la estimulación de la entrada de calcio a las neuronas estriado nigrales frenaba la actividad del dímero D1-D3 y, a través de

estrategias farmacológicas basadas en el empleo de inhibidores selectivos, pudo evidenciarse la participación de la CaMKII, una cinasa de serina treonina activada por calcio y calmodulina en la regulación de la señalización de dicha estructura.

Liu y colaboradores (2008) sugirieron que la interacción de la CaMKII con el receptor dopaminérgico D3 ocurría en un residuo de serina, ubicado en la tercera asa citoplasmática, el cual era fosforilado y esto derivaba en la inhibición de los efectos del receptor sobre la formación de AMPc. Sin embargo también aportaron evidencia de que era necesaria la unión física de ambas proteínas para lograr el mecanismo de regulación mencionado anteriormente. Este punto fue el objeto de esta serie de experimentos: analizar, por medio de co-inmunoprecipitación, si la CaMKII debe asociarse directamente al receptor D3 para bloquear sus efectos sobre la señalización del receptor dopaminérgico. Los resultados obtenidos reflejan un detalle interesante: que el receptor dopaminérgico D3 interactúa de manera basal con la cinasa dependiente de calcio en las terminales estriado nigrales. Este fenómeno se explica porque el receptor D3 representa un sustrato de alta afinidad para la CaMKII debido a sus sitios de fosforilación citoplasmáticos (Liu et al, 2008), situados principalmente en la tercera asa intramembranal, sin embargo esta unión en condiciones basales no es suficiente como para inhibir la señalización del receptor.

Por otra parte, cuando se favorece la activación de la CaMKII a través de la aplicación de un estímulo despolarizante, la interacción CaMKII-D3 se encuentra aumentada, Gou y colaboradores (2010) explican este fenómeno por el hecho de que la autofosforilación de la CaMKII hace a la enzima marcadamente más afín al sustrato que le

representa el receptor dopaminérgico. Puede hipotetizarse por tanto que es necesario el reclutamiento de la CaMKII hacia la tercera asa citoplasmática del receptor, y que esta interacción debe ser constante para que pueda ejercer sus efectos inhibitorios sobre el receptor D3. En cuestión de la regulación del dímero D1-D3 es de destacar que, a pesar de que no logra su separación, si representa un impedimento para ambos receptores de actuar de manera sinergista, probablemente, como se enunció anteriormente, a través de la formación de un complejo heterotrimérico. En conjunto, estos hallazgos representan un mecanismo novedoso de regulación de la liberación del neurotransmisor GABA en el núcleo de salida de los ganglios basales, y adquiere más importancia por ser un blanco potencial para la acción de fármacos destinados a corregir alteraciones motoras, pero sobre todo representa una contribución para el mejor entendimiento de la función y regulación de las interconexiones neuronales.

Efecto de la denervación sobre la interacción CaMKII-D3

Uno de los puntos de mayor atención en este trabajo fue el hallazgo de que, en la denervación dopaminérgica, la estimulación de la actividad de la CaMKII no tiene efecto sobre la señalización del dímero D1-D3, lo cual quedó reflejado también en los experimentos de co-inmunoprecipitación, donde la unión basal de CaMKII y el receptor dopaminérgico D3 no se ve modificada por un estímulo despolarizante.

Podría plantearse la hipótesis de que, la isoforma corta del receptor D3, la cual carece de 21 aminoácidos en la tercera asa citoplasmática, fuera expresada en la denervación y que las secuencias de las cuales carece fueran aquellas a las cuales fosforila

la CaMKII activada, lo cual podría explicar su ausencia de interacción con el receptor dopaminérgico. Sin embargo, tomando en cuenta que el motivo **RILTRQNSQCISIR** donde se localiza la serina 229, el sitio de interacción con CaMKII, se encuentra preservada aún en la isoforma D3 corta (Fishburn, 1993), por lo que no representa una explicación satisfactoria para el fenómeno observado en el lado denervado de ratas hemiparkinsonicas.

Es ampliamente conocido que la depleción de la dopamina nigroestriatal afecta la morfología de las neuronas espinosas medianas y modula la plasticidad sináptica en modelos de Párkinson. Se ha demostrado que la denervación induce cambios en la fosforilación de las proteínas estriatales, involucradas en la señalización de algunos receptores dopaminérgicos (Brown et al, 2005).

Por ello una hipótesis que puede explicar el fenómeno observado es que el estado de fosforilación de la CaMKII haya sido alterado de tal forma que no pueda ejercer adecuadamente su acción de cinasa en el modelo de Párkinson experimental y por ello no sea capaz de migrar a la membrana para unirse a los receptores D3 e inhibir con ello su señalización. Otra alternativa apunta a que la cantidad de CaMKII total haya disminuido en la denervación y por ello, a pesar de ser activada por estímulos despolarizantes, la expresión de la proteína no es suficiente como para frenar los efectos de los receptores dopaminérgicos D3. Estas aseveraciones resultan plausibles y por lo tanto exigen su comprobación, para lo cual se proponen experimentos de Western Blot en sinaptosomas estriado-nigrales con anticuerpos específicos tanto para la CaMKII total, asimismo se requiere de la realización de ensayos para su forma fosforilada, con lo cual puede

discernirse la causa de la ausencia de interacción CaMKII en la denervación dopaminérgica.

12. CONCLUSIONES

- **La interacción entre CaMKII y D3 durante la despolarización no afecta la estructura dimérica D1-D3.**
- **El dímero D1-D3 se encuentra preservado aún en condiciones de denervación.**
- **En el lado intacto de una rata hemiparkinsonica la CaMKII interactúa físicamente con el receptor D3 después de un estímulo despolarizante.**
- **En condiciones de denervación la interacción basal CaMKII- D3 disminuye y la despolarización ya no promueve dicha interacción proteica.**

13. BIBLIOGRAFÍA

Ahlgren-beckendorf, J. A., & Levant, B. (2004). Signaling Mechanisms of the D3 Dopamine Receptor. *Journal of Receptors And Signal Transduction*, 24(3), 117-130.

Basile, M., Lin, R., Kabbani, N., Karpa, K., Kilimann, M., Simpson, I., & Kester, M. (2006). Paralemmin interacts with D3 dopamine receptors: implications for membrane localization and cAMP signaling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 446(1), 60-8.

Bezard, E., Brotchie, J. M., & Gross, C. E. (2001). Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(8), 577-88.

Bongarzone, E. R., Howard, S. G., Schonmann, V., & Campagnoni, A. T. (1998). Identification of the Dopamine D3 Receptor in Oligodendrocyte Precursors : Potential Role in Regulating Differentiation and Myelin Formation. *Brain*, 18(14), 5344-5353.

Bordet, Â., Ridray, S., Schwartz, J.-charles, Sokoloff, P., & Rene, Â. (2000). Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience*, 12.

Brown, A. M., Deutch, A. Y., & Colbran, R. J. (2005). Dopamine depletion alters phosphorylation of striatal proteins in a model of Parkinsonism. *Image (Rochester, N.Y.)*, 22(December 2004), 247-256.

Bézar, E., Ferry, S., Mach, U., Stark, H., Leriche, L., Boraud, T., Gross, C., et al. (2003). Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nature medicine*, 9(6), 762-7.

Chabre, M., Deterre, P., & Antonny, B. (2009). The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends in Pharmacological Sciences*.

Cho, E.-Y., Cho, D.-I., Park, J. H., Kurose, H., Caron, M. G., & Kim, K.-M. (2007). Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(9), 2242-54.

Choi, K. Y., Chung, S., & Roche, K. W. (2011). Differential binding of calmodulin to group I metabotropic glutamate receptors regulates receptor trafficking and signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(16), 5921-30.

Chwartz, J. E. A. N. H. S. (1997). Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Neurobiology*, 94(April), 3363-3367.

Colbran, R. J. (2004). Protein Phosphatases and Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Dependent Synaptic Plasticity. *European Journal of Neuroscience*, 24(39), 8404 - 8409.

Collo, G., Zanetti, S., Missale, C., & Spano, Pierfranco. (2008). Dopamine D3 receptor-preferring agonists increase dendrite arborization of mesencephalic dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *The European journal of neuroscience*, 28(7), 1231-40.

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

Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, Pierfranco, & Missale, C. (2008). Reciprocal Regulation of Dopamine D1 and D3 Receptor Function and Trafficking by Heterodimerization. *Molecular Pharmacology*, 74(1), 59-69.

Fiorentini, C., Busi, C., Spano, Pierfranco, & Missale, C. (2010). Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Current opinion in pharmacology*, 10(1), 87-92. Elsevier Ltd.

Fishburn, C. S., Belleli, D., David, C., Carmon, S., & Fuchss, S. (1993). A Novel Short Isoform of the D3 Dopamine Receptor Generated by Alternative Splicing in the Third Cytoplasmic Loop *. *Biochemistry*, 268(8), 5872-5878.

Gerfen, C. R., & Surmeier, D James. (n.d.). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 441-466.

Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.-charles, Sokoloff, P., & Rene, A. (2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*, 411(May).

Guo, M.-lei, Liu, X.-yu, Mao, L.-min, & Wang, J. Q. (2010). Regulation of dopamine D3 receptors by protein-protein interactions. *Regulation*, 26(2), 163-167.

Gurevich, E. V., Himes, J. W., & Joyce, J. N. (1999). Developmental Regulation of Expression of the D3 Dopamine Receptor in Rat Nucleus Accumbens and Islands of Calleja. *Pharmacology*, 289(1), 587-598.

Gurevich, E. V., Ph, D., Joyce, J. N., & Ph, D. (1999). Distribution of Dopamine D3 Receptor Expressing Neurons in the Human Forebrain : Comparison with D2 Receptor Expressing Neurons. *Pharmacologia*, (98).

Hell, J. W. (2009). Previews Hooked on the D3 Receptor : CaMKII ' s New Addiction. *Neuron*, 61(3), 335-336. Elsevier Inc.

Herna, S., Tkatch, T., Perez-garci, E., Galarraga, E., Hamm, H., & Surmeier, D James. (2000). D2 Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type Ca²⁺ Currents and Excitability via a Novel PLC β 1 – IP3 – Calcineurin-Signaling Cascade. *Channels*, 20(24), 8987-8995.

Ishibashi, T., Wakabayashi, J., & Ohno, Y. (2002). 7-Hydroxy-N, N'-di-n-propyl-2-aminotetraline, a Preferential Dopamine D₃ Agonist, Induces c-fos mRNA Expression in the Rat Cerebellum. *Animals*, 315, 309 - 315.

Karpa, K. D., Lin, R., Kabbani, N., Levenson, R., L, N. G. P. R., State, P., & Hershey, M. S. (2000). The Dopamine D₃ Receptor Interacts with Itself and the Truncated D₃ Splice Variant D₃nf: D₃-D₃nf Interaction Causes Mislocalization of D₃ Receptors. *Molecular Pharmacology*, 58(4), 677-683.

Liu, X.-Y., Mao, L.-M., Zhang, G.-C., Papasian, C. J., Fibuch, E. E., Lan, H.-X., Zhou, H.-F., et al. (2009). Activity-dependent modulation of limbic dopamine D₃ receptors by CaMKII. *Neuron*, 61(3), 425-38. Elsevier Ltd.

Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., et al. (2008). 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*, 283(38), 26016-25.

Milligan, G. (2008). REVIEW, A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *British Journal of Pharmacology*, 216-229.

Milligan, Graeme, Ramsay, D., Pascal, G., & Carrillo, J. J. (2003). GPCR dimerisation. *Journal of Biological Chemistry*, 74, 181 - 188.

Milligan, Graeme. (n.d.). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Pharmacology*.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Caron, M. G., Benchoua, A., Trioulier, Y., Diguët, E., et al. (2008). Dopamine Receptors : From Structure to Function, 189-225.

Neve, K. A., Seamans, J. K., & Trantham-davidson, H. (2004). Dopamine Receptor Signaling. *Journal Of Receptors And Signal Transduction*, 24(3), 165-205.

Picconi, B., Gardoni, F., Centonze, D., Mauceri, D., Cenci, M. A., Bernardi, G., Calabresi, P., et al. (2004). Abnormal Ca²⁺ – Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function Mediates Synaptic and Motor Deficits in Experimental Parkinsonism, 24(23), 5283-5291.

Pou, C., Stoddart, L. A., Millan, M. J., & Milligan, Graeme. (2012). Functional Homomers and Heteromers of Dopamine D_{2L} and D₃ Receptors Co-exist at the Cell Surface. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 8864 -8878.

Prieto, G. A., Perez-burgos, A., Palomero-rivero, M., Drucker-colin, R., Bargas, J., Prieto, G. A., Perez-burgos, A., et al. (2012). Upregulation of D₂-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D₃ receptors acting on Ca^v2.1 channels via PIP₂ depletion Upregulation of D₂-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D₃ receptors acting on Ca^v2.1 channels via PIP₂ depletion. *Journal of Neurophysiology*, (March 2011), 2260-2274.

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

Richtand, N. M., Liu, Y., Ahlbrand, R., Sullivan, J. R., Newman, A. M. Y. H., & Mcnamara, R. K. (2010). Dopaminergic Regulation of Dopamine D3 and D3nf Receptor mRNA Expression. *Synapse*, 643(November 2009), 634-643.

Ridray, S., Griffon, N., Mignon, V., Souil, E., Carboni, S., & Diaz, J. (1998). Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat : opposite and synergistic functional interactions. *Neuroscience*, 10(January), 1676-1686.

Sato, K., Ueda, H., Okumura, F., & Misu, Y. (1994). 6-OHDA-induced lesion of the nigrostriatal dopaminergic neurons potentiates the inhibitory effect of 7-OHDPAT , a selective D 3 agonist , on acetylcholine release during striatal microdialysis in conscious rats. *Brain Research*, 655, 233-236.

Shafer, R. A., & Levant, B. (1998). The D3 dopamine receptor in cellular and organismal function. *Molecular Biology*, 1-16.

Shioda, N., Takeuchi, Y., & Fukunaga, K. (2010). Advanced Research on Dopamine Signaling to Develop Drugs for the Treatment of Mental Disorders : Proteins Interacting With the Third Cytoplasmic Loop of Dopamine D 2 and D 3 Receptors, 31, 25 - 31.

Smith, N. J., & Milligan, Graeme. (2010). Allostery at G Protein-Coupled Receptor Homo- and Heteromers: Uncharted Pharmacological Landscapes. *Molecular Pharmacology*, 62(4), 701-725.

Surmeier, D J, Yan, Z., & Song, W. J. (1998). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 42(20), 1020-3.

Zhang, L., Lou, D., Jiao, H., Zhang, D., Wang, X., Xia, Y., & Zhang, J. (2004). Cocaine-Induced Intracellular Signaling and Gene Expression Are Oppositely Regulated by the Dopamine D1 and D3 Receptors. *Gene Expression*, 24(13), 3344 -3354.

Ã, R. J. C., & Brown, A. M. (2004). Calcium / calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*.