



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Farmacología

TESIS

*“Papel de la isoforma D3nf en el control de la actividad de receptores D3
presinápticos de la sustancia nigra.”*

Que presenta

Biól. Carlos Eduardo Velázquez Pérez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

FARMACOLOGÍA

Director de tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

México D.F

Diciembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a CONACyT por la beca otorgada para la realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo al proyecto con número 152326

Quiero agradecer al Dr. Benjamín Florán por invitarme a formar parte del grupo de trabajo en su laboratorio así como el apoyo siempre otorgado. Muchas Gracias.

Al Dr. Jorge Aceves Ruíz por su asesoría durante el proyecto. Gracias.

Al Dr. Javier Camacho Arroyo por su apoyo y asesoría para realizar el proyecto, además por las facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio. Gracias.

También quiero agradecer a los técnicos y auxiliares del laboratorio. Francisco Paz, Chelita y José Luis. Por su apoyo constante muchas gracias.

A todos mis compañeros del Laboratorio #4 y #7 gracias por hacer un excelente ambiente de trabajo. En especial a Sacnité, Gabriel, Marina, Santiago, Liz, Víctor, César, Uriel, Rodo, Lupita y Arturo.

Dedicatorias

A mi mamá Magnolia y mi tía Nelly por ser las personas más importantes en mi vida, por el apoyo y confianza siempre otorgada, sin ustedes nunca llegaría lejos, les agradezco infinitamente.

A mi hermano Alejandro por sus consejos y por siempre escucharme mil gracias.

Para mi hermanita Adriana por su cariño y ayuda siempre, las palabras no me alcanzan para agradecerle todo lo que haces por mí.

A mis tíos Raúl y Susy por su cariño y confianza depositada muchas gracias.

A mis primos Raúl, Mauricio, Laura, Brenda por todas las risas y complicidades.

A mis amigos y compañeros de maestría. Erika, Esme, Alejandro, Sendi, Víctor, Humberto y Liliana por los buenos momentos.

A Marco y Karla por todo el apoyo incondicional, por las risas y los momentos tristes por compartir una amistad con grandes valores. Por ser parte esencial durante este proyecto. Mil Gracias.

A Ari, Caro y Killiam Gracias por ese cariño recíproco, por las complicidades y por hacer ligero este camino, los quiero a muchísimo.

A Daniel por todo el apoyo y cariño incondicional.

A Raúl, Can-Ek, Rocío Arías, Rocío Meneses, Michelle, Julissa, Mariana, Lili, Ayezha, Gaby, Alejandra, Felipe, Jose Luis, Karina, Paquito y Oscar. Por esa amistad de años, aunque están lejos siempre los llevo en el corazón.

A Sácnite, Gabriel, Marina, Santiago y Liz. Mil gracias por todo el apoyo sin ustedes esto no hubiera sido posible y sobre todo por permitirme conocerlos y formar una gran amistad.

Y por último pero no menos importante a mí por alcanzar metas que jamás imaginé por tener el valor y el carácter de continuar no importando las adversidades.

ÍNDICE.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
GANGLIOS BASALES	9
Organización anatómica	9
<i>Núcleo Estriado (Caudado-Putamen).....</i>	<i>10</i>
<i>Globo Pálido</i>	<i>10</i>
<i>Núcleo Subtalámico.....</i>	<i>11</i>
<i>Sustancia Nigra.....</i>	<i>11</i>
Organización Funcional de los Ganglios Basales	12
Vía Directa	13
Vía Indirecta.....	13
SISTEMA DOPAMINÉRGICO	14
Dopamina.....	14
Síntesis y Liberación.....	15
Receptores a Dopamina	17
<i>Receptores a Dopamina Tipo D1</i>	<i>18</i>
<i>Receptores a Dopamina Tipo D2.....</i>	<i>19</i>
Farmacología de los receptores a Dopamina	20
Señalización de los receptores Dopaminérgicos	22
ENFERMEDAD DE PARKINSON	25
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
SUJETOS EXPERIMENTALES.....	31
LESIÓN UNILATERAL CON 6-HIDROXIDOPAMINA	31
PRUEBA CONDUCTUAL.....	31
SOLUCIONES.....	32
OBTENCIÓN DE REBANADAS.....	32
OBTENCIÓN DE SINAPTOSOMAS	33
OBTENCIÓN DE MEMBRANAS.....	33
WESTERN BLOT.....	34
INMUNOFLOURESCENCIA.....	35
BINDING	36
RESULTADOS.....	37

Expresión de receptores D1 por Western Blot	37
Expresión de receptores D3 por Western Blot.....	38
Distribución y expresión de la isoforma D3nf.....	39
Binding de membranas de receptores D3	41
DISCUSIÓN	42
Receptores D1.....	42
Receptores D3.....	43
Isoforma D3nf.....	44
Binding de receptores D3 membranas	45
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
7-OH-DPAT	7-hidroxidpat
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CAMK	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina
COMT	Catecol-O-Metiltransferasa
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina 32kD
DAT	Transportador de Dopamina
GDP	Guanina difosfato
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GIRK	Canal rectificador entrante de K ⁺
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamina oxidasa
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sustancia nigra compacta
SNr	Sustancia nigra reticulada
STN	Núcleo subtalámico
TH	Tirosina Hidroxilasa
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa en la cual existe una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta que inerva a los ganglios basales, estructuras encargadas de modular el movimiento a través de dos vías: una vía directa que estimula el movimiento y una indirecta que lo inhibe. Clásicamente se acepta que en la vía directa se expresan receptores a dopamina tipo D1 mientras que en la vía indirecta se expresan preferencialmente receptores de la familia tipo D2 sin embargo se ha localizado un dímero D1-D3 en las terminales estriado-nigrales perteneciente a la vía directa, en el cual el receptor D3 tiene la capacidad de potenciar la formación de AMPc y la liberación de GABA estimulada por receptores D1. En condiciones de denervación existe un efecto antagónico entre estos receptores que ha sido difícil de esclarecer. Existe una isoforma del receptor a dopamina D3 denominada D3nf la cual puede secuestrar receptores D3 en la membrana y llevarlo a compartimentos citosólicos, este sistema pudiera estar actuando en las terminales estriado-nigrales; por lo cual el objetivo del trabajo fue dilucidar lo que ocurre con esta dinámica de receptores.

Los datos obtenidos nos muestran que existe una disminución de los receptores D1 en el estriado y en sinaptosomas de la SNr, aunado a un aumento de los receptores D3 en condiciones de denervación, además de que existe una disminución de la isoforma D3nf en estas mismas condiciones y un aumento de receptores D3 en la membrana del estriado. Esto nos indica que existe una dinámica más complicada y el entendimiento de esta nos ayudará a proponer a largo plazo nuevos blancos farmacológicos para la enfermedad de Parkinson.

SUMMARY

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder caused by their loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra compact that innervates the basal ganglia, which are structures responsible for modulating movement through two routes: a direct path that stimulates the motion and an indirect path that inhibits it. Classically it is accepted that in the direct path dopamine D1 receptors are expressed whereas in the indirect pathway preferentially D2 type receptor family are expressed, however it has been located a dimer D1- D3 in the striato-nigral terminals belonging to the direct path. The D3 receptor has the ability to enhance cAMP formation and release of GABA produced by D1 stimulation but in denervation exists an antagonistic effect between receptors that has been difficult to clarify. There is an isoform of the D3 dopamine receptor called D3nf which can internalize D3 receptors in the membrane and cytosolic compartments, this system could be acting on the striatal-nigral terminals, so the aim of this work was to determine what happens to this dynamic of receptors.

The data obtained show that there is a reduction in D1 receptors in the striatum and the SNr synaptosomes coupled with an increase in D3 receptor denervation conditions, besides there is a decrease in the D3nf isoform in the same conditions and D3 receptors increased in the striatal membrane. This indicates that there is a more complicated dynamics and understanding of this will help us to propose new long-term pharmacological targets for Parkinson's disease.

INTRODUCCIÓN

GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son un grupo de estructura subcorticales que se localizan en la base del telencéfalo y se encuentran interconectadas, este sistema se encarga de controlar principalmente los movimientos finos.

Organización anatómica

El sistema de los ganglios basales esta compuesto por diferentes núcleos (Figura 1.) estos son : el núcleo estriado en sus regiones caudado y putamen, el globo pálido en sus porciones externa(GPe) e interna(GPi), la sustancia nigra que se subdivide en sustancia nigra reticulada(SNr) y sustancia nigra compacta(SNc), por último se localiza el núcleo subtalámico (STN) (Bar-Gad et al., 2003; Blandini et al., 2000; Bolam et al., 2000; Gerfen et. al., 2011). Estos núcleos son descritos a continuación.

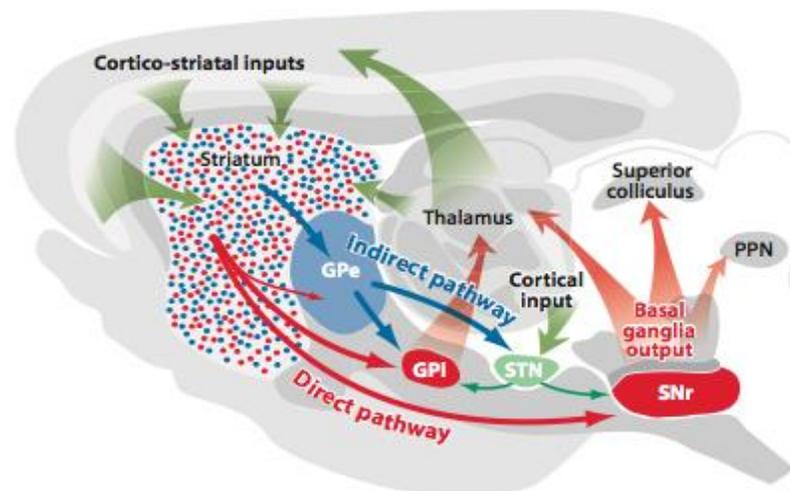


Figura 1.- Organización anatómica de los ganglios basales. Esquema de un corte sagital de cerebro en donde se representan los núcleos Estriado, GPe, Gpi, STN, SNr, SNc. Así como estructuras externas como el tálamo, corteza, colículo superior y pedúnculo pontino, de igual manera se representa de color rojo la vía directa y de color azul la vía indirecta (Tomado de Gerfen et. al., 2011).

Núcleo Estriado (Caudado-Putamen)

El núcleo estriado es el principal núcleo de entrada de información que proviene de la corteza de naturaleza glutamatérgica excitatoria (McFarland et. al., 2000). En los primates este núcleo se divide en dos: caudado y putamen, en los roedores se conforma por un solo núcleo, la mayor parte de las neuronas del estriado utiliza el ácido- γ -aminobutírico (GABA) aproximadamente el 95 % de las neuronas son morfológicamente iguales estas son llamadas neuronas espinosas medianas y son de proyección, mientras el 5% restante son interneuronas (Blandini et. al., 2000; Cicchetti et. al., 2000; Tepper et. al., 2004). Las neuronas de proyección del estriado utilizan al GABA como neurotransmisor y pueden co-liberar dos tipos de neurotransmisor: encefalinas y sustancia P. Las neuronas que se proyectan del estriado hacia el GPe se caracterizan por co-liberar encefalinas y expresan receptores dopaminérgicos de la familia tipo D2 (Gerfen et. al., 1995). Por otro lado las neuronas que proyectan a la SNr co-liberan sustancia P/dinorfina y principalmente expresan receptores a dopamina de la familia Tipo D2 (Gerfen et. al., 1995).

Globo Pálido

EL globo pálido también denominada complejo palidal comprende de dos segmentos en primates: el globo pálido interno (GPi) y el globo pálido externo (GPe) mientras que en los roedores el segmento interno es el núcleo entopeduncular y el externo el globo pálido (Blandini et. al., 2000; Utter et. al., 2008). Las neuronas del globo pálido externo proyectan principalmente al núcleo subtalámico y son de naturaleza GABAérgicas, existen también proyecciones hacia la sustancia nigra y el núcleo reticular del tálamo (Bolam et al., 2000; Smith et. al., 1989). Se ha observado que las neuronas palidales expresan receptores dopaminérgicos tipo D2 principalmente los receptores D4 que se encuentran tanto en el soma como en terminales presinápticas del STN y SNr (Ariano et al., 1994; Flores et al., 1999; Kahn et al., 1998).

Núcleo Subtalámico

El núcleo subtalámico es el único dentro de los ganglios basales cuyas neuronas son de naturaleza glutamatérgica, esto quiere decir que son neuronas de tipo excitatoria, son células fusiformes piramidales o redondas (Lee et. al., 2004). Sus neuronas proyectan principalmente a los núcleos de salida (SNr/GPi) aunque también existen eferentes que van hacia el GPe, y algunas proyecciones son hacia el estriado, SNc y corteza motora (Patent et. al., 1995). El Núcleo subtalámico recibe inervaciones de GABAérgicas inhibitorias del GPe así como dopaminérgicas de la SNc (Hassani et al., 1997; Karachi et al., 2004).

Sustancia Nigra

La sustancia nigra se extiende a lo largo del mesencéfalo y en la parte caudal del diéncéfalo, estructuralmente se distinguen dos regiones : una región compacta que se localiza en la región caudal del mesencéfalo y una porción reticulada localizada en la porción ventral (Albin et al., 1989).

Sustancia nigra pars compacta

La sustancia nigra pars compacta (SNc) son neuronas que contienen neuromelamina que es un pigmento oscuro característico de este núcleo derivado de la oxidación y polimerización de la dopamina que es el neurotransmisor que utiliza este núcleo, las aferentes de la SNc provienen de diferentes núcleos como el estriado y el globo pálido, también existen proyecciones provenientes de la sustancia nigra reticulada, incluso se han descrito proyecciones glutamatérgicas que vienen del SNT y de la corteza (Blandini et al.; 2000; Ribak et al., 1980; Tepper et al., 1995; Smith et al., 1996).

La SNc manda sus proyecciones dopaminérgicas prácticamente a todos los núcleos de los ganglios basales (Estríado, SNr, GPe, STN) regulando así la dopamina la actividad y dinámica en este circuito motor. (Blandini et al., 2000; Utter et al., 2008).

Sustancia nigra pars reticulada

La sustancia nigra pars reticulada se considera el núcleo de salida de información de los ganglios basales en conjunto con el globo pálido interno ya que de forma final la información es integrada en estos núcleos y dirigida al tálamo. Estos núcleos presentan una actividad tónica lo que produce una inhibición sostenida de las neuronas tálamo-corticales, la SNr proyecta hacia la parte ventral del tálamo y al colículo superior, así mismo recibe inervación tanto GABAérgica del estríado como glutamatérgica proveniente del STN, existe una pequeña porción que inerva del GPe y otra de la SNc (Blandini et al., 2000; Vilchis et al., 2000; Gulcebi et al., 2012). Cambios en la actividad neuronal de la SNr tienen consecuencias sobre la actividad motora (Gerfen et al., 2011).

Organización Funcional de los Ganglios Basales

Los núcleos descritos anteriormente se encuentra interconectados formando un circuito de neuronas que procesan la información proveniente de la corteza a través de dos vías: la vía directa que de manera final da como resultado la activación o facilitación del movimiento y la vía indirecta que promueve la inhibición del movimiento (Figura 2).

Vía Directa

La vía directa lleva su nombre debido a que neuronas del estriado que es el principal núcleo de entrada de la información que proviene de la corteza manda directamente sus eferentes al núcleo de salida la SNr, estas neuronas GABAérgicas inhiben a la SNr dejando así libres a las neuronas del tálamo que se encontraban bajo el control de la SNr para ejercer su efecto excitatorio sobre la corteza y promover el movimiento; clásicamente en esta vía se expresan receptores dopaminérgicos del tipo D1 y que coliberan sustancia P/dinorfina (Gerfen et al., 2011; Penney et al., 1983).

Vía Indirecta

La vía indirecta es la encargada de inhibir el movimiento y de manera particular se opone al efecto de la vía directa. En la vía indirecta neuronas del estriado mandan sus proyecciones de naturaleza GABAérgicas al GPe que es el primer núcleo de relevo en los ganglios basales en esta vía, así las neuronas del GPe están inhibidas y no pueden ejercer su efecto inhibitorio sobre el segundo núcleo de relevo, el núcleo subtalámico. El STN proyecta sus eferente glutamatérgicas excitatorias hacia la SNr por lo tanto la SNr queda libre para ejercer su efecto GABAérgico inhibitorio sobre las neuronas del tálamo las cuales quedarán inhibidas y no podrán ejercer su efecto inhibitorio sobre la corteza por lo cual el movimiento será inhibido. Se conoce que en esta vía se expresan principalmente receptores a dopamina del tipo D2 que además coliberan encefalinas (Alexander et al., 1990).

Así pues parece contradictorio que una vía inhiba el movimiento y otra la inhiba quien resuelve esta contradicción es la dopamina que es proporcionada por la sustancia nigra pars compacta la cual regula la actividad de estas dos vías y que de forma sinérgica promueve el movimiento en este modelo clásico sin embargo deben considerarse nuevas propuestas sobre los ganglios basales. (Bolam et al., 2000; Gerfen et al., 1992).

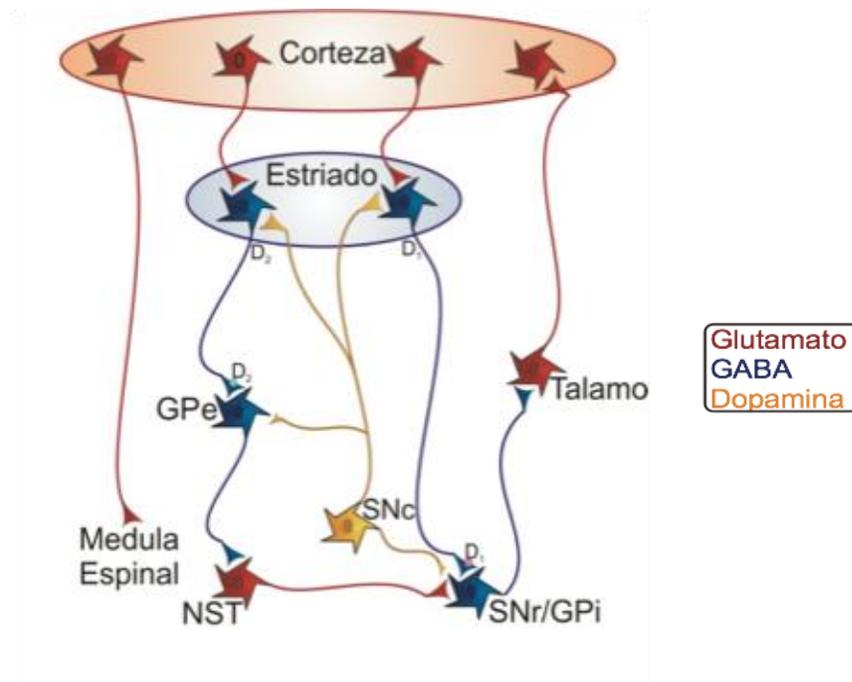


Figura 2.- Representación esquemática de los ganglios basales. En color azul se muestran las proyecciones GABAérgicas, en color rojo se muestran las proyecciones glutamatérgicas, de color amarillo se muestran las inervaciones de la SNc, así también se observan la expresión preferencial de los receptores tipo D1 en la vía directa y de los tipo D2 en la vía indirecta.

SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor clasificado como amina biogénica. Es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados superiores, controla una gran cantidad de funciones vitales como la ingesta de alimentos, regulación endocrina, memoria, cognición, regulaciones endocrinas y la actividad locomotora entre otras. (Missale et al., 1998). A nivel periférico actúa como modulador en diferentes sistemas como el cardiovascular, renal y gastrointestinal (Zeng et al., 2004).

Síntesis y Liberación

La dopamina se sintetiza tanto en el soma como en las terminales nerviosas dopaminérgicas, a partir del aminoácido Tirosina al cual se le añade un hidroxilo en posición orto para formar el grupo catecol y por medio de la tirosina hidroxilasa (TH) la cual dará lugar a la formación a la L-Dopa, una vez formada la L-Dopa es transformada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) para dar paso a la formación de dopamina (Figura 3).

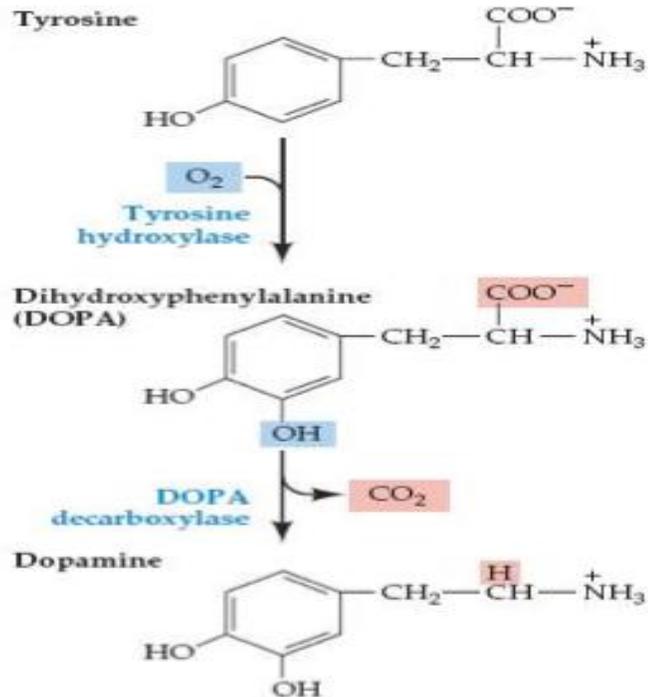


Figura 3.- Síntesis de la dopamina. La dopamina es sintetizada a partir de la tirosina y por acción de la TH es convertida en L-DOPA la cual sufre una descarboxilación por la AADC dando paso a la formación de la dopamina.

Una vez transformada la dopamina puede ser degradada por la monoamino oxidasa tipo A (MAO-A) dando lugar al ácido 3,4dihidroxifeniacético (DOPAC), también puede ser degradada extracelularmente por la catecol-O-metil transferasa (COMT) resultando como producto el ácido homovanílico (HVA) (Figura 4).

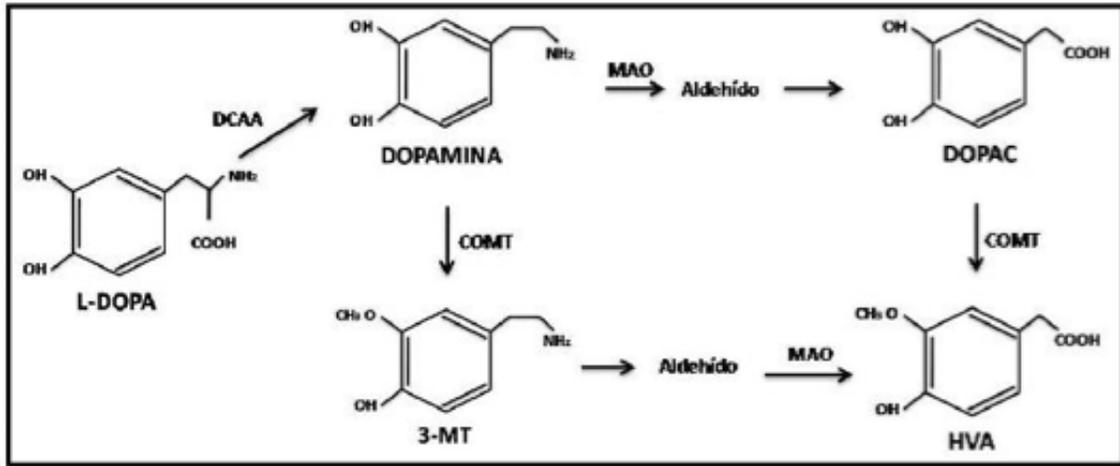


Figura 4.- Metabolismo de la dopamina. Una vez sintetizada puede ser degradada por dos enzimas la MAO-A que dará como producto final DOPAC y por la COMT que la metaboliza a HVA.

O ser incorporada a vesículas para su posterior liberación por medio del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) para ser liberada principalmente por exocitosis mediante la llegada de un pulso despolarizante existe un influjo masivo de calcio promoviendo la fusión de las vesículas a la membrana (Figura 5). Una vez liberada a los espacios pre y post sinápticos puede ser recapturada por los transportadores a Dopamina (DAT)

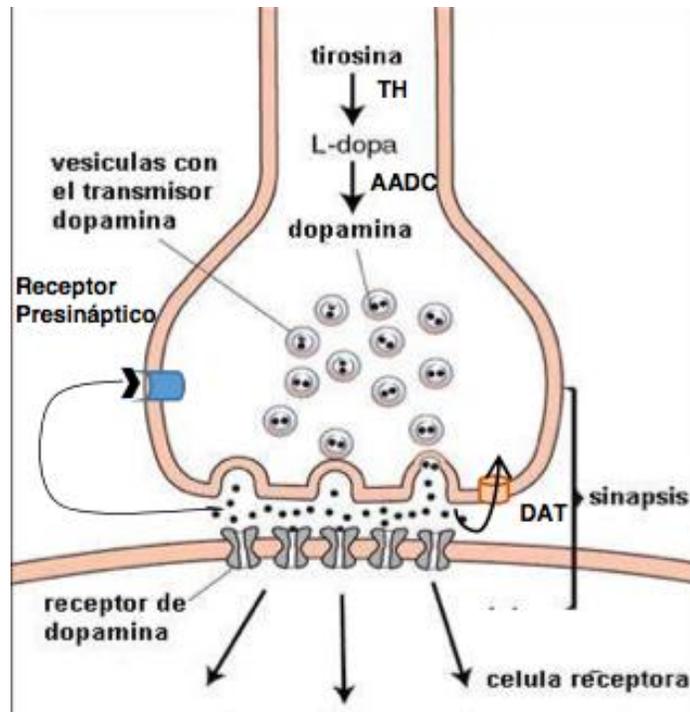


Figura 5.- Liberación, almacenamiento y recaptura de dopamina. Una vez sintetizada la dopamina puede ser captada en el interior de vesículas por los VMAT para su posterior liberación a través de exocitosis, una vez liberado en el espacio extracelular puede ser recapturado por los DAT

Receptores a Dopamina

Las acciones fisiológicas de la dopamina están mediadas por sus receptores, los receptores a dopamina son receptores clásicos de 7 hélices transmembranales (Figura 6) acoplados a proteínas G heterotiméricas (GPCRs) son cinco diferentes receptores que se encuentran íntimamente relacionados y dependiendo de la acción que ejerzan sobre la adenilato ciclasa (AC) así como sus propiedades bioquímicas y farmacológicas se dividen principalmente en dos grandes familias, los del tipo D1 y los del tipo D2. (Andersen et. al.,1990; Vallone et. al., 2000; Spano et. al., 1978) .

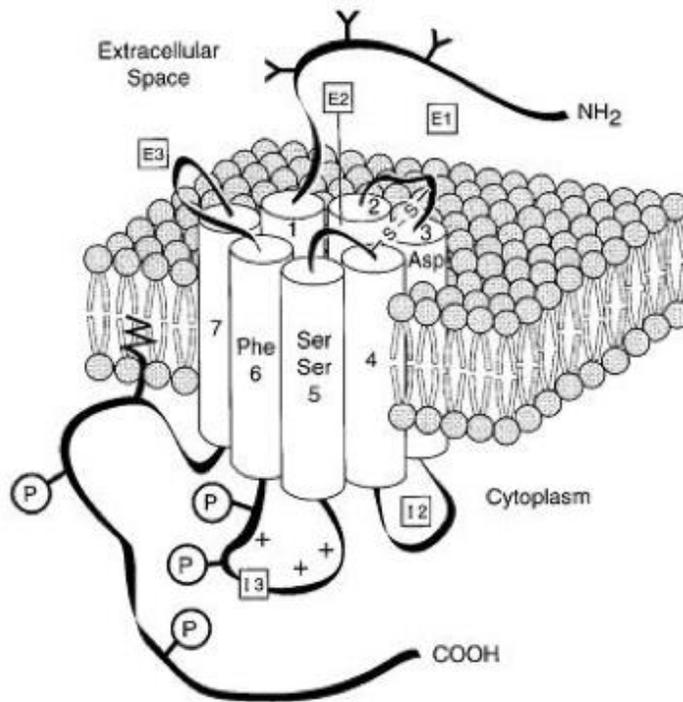


Figura 6.- Esquema representativo de un receptor dopaminérgico. Conformado por 7 hélices transmembranales presentando una porción amino en el espacio extracelular y una carboxilo en su porción intracelular, los receptores de la familia tipo D2 se caracterizan por tener una tercer asa intracelular más grande que los de la familia tipo D1.(Tomado de Missale et al., 1998).

Receptores a Dopamina Tipo D1

Los receptores que integran a la familia del tipo D1 son los receptores D1 y D5, el D1 está compuesto por 446 aminoácidos mientras que el receptor D5 está compuesto por 447 aminoácidos es bien aceptado que estos receptores se acoplan a proteínas G heterotiméricas (Gs/olf) las cuales van a estimular la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) a través de la adenilato ciclasa (AC). (Zhuang et al., 2000).

Existe una amplia distribución y expresión de los receptores D1 en la vía directa (nigro-estriado), así como en áreas mesolímbicas, mesocorticales, núcleo accumbens, bulbo olfatorio, amígdala y corteza prefrontal, y en bajos niveles en regiones como el hipocampo, cerebelo y áreas hipotalámicas. El receptor D5 se localiza y expresa en niveles bajos en regiones como corteza prefrontal en neuronas piramidales principalmente, corteza premotora, corteza entorreinal, giro dentado entre otras, y una mínima expresión en las neuronas espinosas medianas en la región caudada del estriado y en el núcleo accumbens (Beaulieu et al., 2011; Gerfen et al., 2000; Missale 1998; Rankin et al., 2000; Sokoloff et al., 2006).

La respuesta a la activación de los receptores D1 en los ganglios basales es la liberación de GABA (Florán et al., 1990) y depende de un influjo de calcio a la neurona por la activación de canales de calcio tipo P/Q (Arias-Montaña et al., 2007).

Receptores a Dopamina Tipo D2

Por otra parte los receptores que integran a la familia del tipo D2 están compuestos por los D2, D3 y D4. Estos receptores se acoplan a proteínas Gi las cuales inhiben la formación de AMPc a través de la AC. El receptor D2 presenta 2 isoformas (D2s y D2L) que se diferencian en el número de aminoácidos que componen la tercer asa intracelular, el receptor D3 está conformado por 400 aminoácidos y presenta 7 isoformas diferentes 2 son típicos receptores a dopamina y las 5 restantes son formas truncadas, por último los receptores D4 compuesta por 387 aminoácidos presenta diferentes variantes con secuencias repetidas en su tercer asa intracelular (Rankin et al., 2010; Rondou et al., 2010; Sokoloff et al., 2006; Van Tol et al., 1992).

Los receptores D2 se han localizado en el núcleo accumbens, bulbo olfatorio, sustancia nigra, área ventral tegmental, hipotálamo, áreas corticales, septum, amígdala e hipocampo (Gerfen, 2000; Missale et al., 1998; Seeman et al., 2006; Vallone et al., 2000). Mientras que los receptores D3 tienen un patrón más limitado ubicándose en áreas límbicas como la porción Shell del núcleo accumbens, en otras regiones como el tubérculo olfatorio y las islas de Calleja, en menor medida se ha localizado en el estriado, sustancia nigra pars compacta, área ventral tegmental, hipocampo, área septal y diferentes zonas de la corteza (Missale et al., 1998; Sokoloff et al., 1992, 2006). Los receptores D4 están localizados en la corteza frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, globo pálido, SNr y tálamo (Missale et al., 1998; Rondou et al., 2010).

Farmacología de los receptores a Dopamina

Cada receptor de los dos tipos de familia presenta características farmacológicas muy definidas, el uso de antagonistas y agonistas selectivos ha ayudado al estudio de estos receptores.

De manera particular los receptores D1 y D5 no se han podido diferenciar farmacológicamente sin embargo la afinidad por el (+)-butaclamol que es un antagonista es un poco mayor para los receptores D1 (Seeman et al., 1994). Los agonistas sintetizados para estos receptores presentan afinidades muy similares la diferencia se encuentra en el agonista natural que es la dopamina la cual tiene una afinidad 10 veces mayor por el receptor D5 (Missale et al., 1998).

El haloperidol y la espiperona presentan una afinidad de 10 y 20 veces mayor por los receptores D2 que por los receptores D3 sin embargo la clozapina, sulpiride y raclopride no son capaces de diferenciar a los receptores D2 y D3 (Missale et al., 1998; Sokoloff et al., 1990).

Respecto a los receptores D3 estos tienen una afinidad 20 veces mayor por la dopamina respecto a los D2 y hasta 70 veces mayor que los receptores D1 (Ritchand et al., 2001; Robinson et al., 1994). Se ha logrado desarrollar agonistas selectivos para el D3 el PD 128907 y el 7-OH DPAT así como el antagonista selectivo GR 103691 (Audinot et al., 1998; Zapata et al., 2002).

El receptor D4 presenta una gran afinidad por la clozapina a diferencia de los receptores D2 y D3 (Van Tol et al., 1991).

Como he mencionado cada receptor tiene una característica única tanto en su composición molecular, farmacología, distribución y expresión (Tabla 1). Por lo cual el estudio de estos receptores ha tomado varios años y aun siguen sin esclarecerse todas las interacciones.

Dopamine Receptor Subtype	D1	D2	D3	D4	D5
Gene symbol	<i>DRD1</i>	<i>DRD2</i>	<i>DRD3</i>	<i>DRD4</i>	<i>DRD5</i>
Chromosomal gene map locus	5q35.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5	4p16.1
Number of introns in the coding region	None	6	5	3	None
Pseudogenes	None	None	None	None	<i>DRD5P1</i> , <i>DRD5P2</i>
Presence of splice variants	None	Yes D2S, D2L	Yes	Yes	None
Number of amino acids	446	D2S, 414; D2L, 443	400	387	477
Molecular weight	49,300	D2S, 47,347; D2L, 50,619	44,225	41,487	52,951
G protein coupling	G α_s , G α_{olf}	G α_s , G α_o	G α_s , G α_i	G α_s , G α_q	G α_s , G α_q
Selective agonists	Fenoldopam, SKF-38393, SKF-81297	Bromocriptine, pergolide, cabergoline, ropinirole	7-OH-DPAT, pramipexole, rotigotine, (+)-PD-128907	A-412997, ABT-670, PD-168,077	None
Selective antagonists	SCH-23390, SCH-39166, SKF-83566	Haloperidol, spiperone, raclopride, sulpiride, risperidone	Nafadotride, GR 103,691, GR 218,231, SB-277011A	A-381393, FAUC 213, L-745,870, L-750,667	None

7-OH-DPAT, hydroxy-2-dipropylaminotetralin; A-381393, 2-[4-(3,4-dimethylphenyl)piperazin-1-ylmethyl]-1H-benzimidazole; A-412997, N-(3-methylphenyl)-2-(4-pyridin-2-yl)piperidin-1-ylacetamide; ABT-670, 3-methyl-N-(1-oxo-3',4',5',6'-tetrahydro-2H-[2,4'-bipyridine]-1'-ylmethyl)benzamide; FAUC 213, 2-[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-a]pyridine; GR 218,231, (+)-(2R)-1,2,3,4-tetrahydro-6-[[4-methoxyphenyl]sulfonyl(methyl)-N,N-dipropyl-2-naphthalenamine; GR 103,691, 4'-acetyl-N-[4-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)butyl]-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide; L-745,870, 3-(4-[4-chlorophenyl]piperazin-1-yl)-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine; L-750,667, 3-(4-(4-iodophenyl)piperazin-1-yl)methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine; PD-128907, (4aR,10bR)-3,4a,4,10b-tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano[4,3-b]-1,4-oxazin-9-ol; PD-168,077, N-[[4-(2-cyanophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-3-methylbenzamide-(2Z)-but-2-enedioic acid; ; SB-277011A, N-[trans-4-(2-(6-cyano-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)ethyl)cyclohexyl]quinoline-4-carboxamide; SCH-39166, (-)-trans-6,7,7a,8,9,13b-hexahydro-3-chloro-2-hydroxy-N-methyl-5H-benzo[d]naphtho[2,1-b]azepine; SKF-38393, 2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1H-3-benzazepine; SKF-81297, (±)-6-chloro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrobromide; SKF-83566, 8-bromo-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepin-7-ol.

Tabla 1.- Características Generales de los receptores a Dopamina. En la tabla se muestra la ubicación del gen, el número de intrones, los genes, isoformas, peso molecular, tipo de acople a proteína G así como algunos agonistas y antagonistas selectivos para cada uno de los receptores (Tomado de Beaulieu et al., 2011).

Señalización de los receptores Dopaminérgicos

Los receptores dopaminérgicos efectúan su acción a través de proteína G las cuales se clasifican en 4 grandes familias $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, y $G_{\alpha 12}$. En general las proteínas G están constituidas por 3 subunidades: α , β y γ la clasificación está basada en la naturaleza de la secuencia de la subunidad α y su característica funcional (Tabla 2). La subunidad α se encuentra unida a la membrana por una modificación lipídica ya sea miristilación o palmitoilación y la subunidad $\beta\gamma$ está anclada a la membrana por isoprenilación de la subunidad γ (Milligan et al., 1997; Pierce et al., 2002; Zhang et al., 1996).

En estado basal, la subunidad G_{α} se encuentra unida a GDP y al complejo $G_{\beta\gamma}$. La interacción del receptor con su respectivo ligando, resulta en la disociación de GDP de la subunidad G_{α} del complejo heterotrimérico, siendo reemplazado por GTP. La unión de GTP a la subunidad G_{α} provoca un cambio conformacional que disocia el complejo heterotrimérico, separando la subunidad G_{α} del complejo $G_{\beta\gamma}$, teniendo estos diferentes efectores (Offermanns et al., 2003). La actividad GTPasa de la subunidad G_{α} termina con el estado de activación de la proteína G, induciendo la re-asociación del complejo heterotrimérico, quedando unida de nuevo la subunidad G_{α} a GDP y al complejo $G_{\beta\gamma}$.

Subunidad	Efactor	Función
$G_{\alpha s}/olf$	Adenilato Ciclasa (AC)	↑ Formación de AMPc
$G_{\alpha i}/o$	Adenilato Ciclasa (AC)	↓ Formación de AMPc
$G_{\alpha q}/11$	Fosfolipasa C tipo β (PLC- β)	Liberación de Ca^{+2} de compartimento intracelulares

Tabla 2.- Características Generales de las diferentes subunidades de Proteínas G_{α} . Se muestra el principal efector de las subunidades y la función inmediata. ↑Aumento en la formación de AMPc, ↓Disminución en la formación de AMPc .

Los receptores D1 y D5 se encuentran acoplados a proteínas G α s, particularmente en el estriado el receptor D1 se acopla a proteínas G α olf (Zhuang et al., 2000), por lo tanto, la activación de ambos estimula a la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc intracelular (Monsma et al., 1990), a su vez, el incremento de AMPc estimula a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) removiendo sus 2 subunidades regulatorias para dejar libres sus subunidades catalíticas, las subunidades catalíticas fosforilan canales de Ca⁺², activando el influjo de Ca⁺² a la célula, así también, la PKA puede activar a diferentes proteínas que participan en la regulación de la expresión de genes (Fig. 7).

Como se mencionó anteriormente, los receptores D1 son capaces de regular la actividad de varios canales iónicos a través de la activación de la PKA. Se ha mostrado que estimula la actividad de canales iónicos de Ca²⁺ tipo L, N, P, Q, NMDA, AMPA y GABA. Por otro lado, se ha mostrado que inhibe canales de Na⁺, canales de K⁺ dependientes de voltaje, así como canales rectificadores entrantes de K⁺ (GIRKs) (Neve, et al., 2004). Adicionalmente la misma PKA fosforila la proteína fosfatasa regulada por dopamina (DARPP-32).

DARPP-32 en estado fosforilado en el residuo treonina 34 (T34), se transforma en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1). En neuronas del estriado, estudios electrofisiológicos mostraron que la activación de receptores D1 incrementa las corrientes NMDA y que esto es mediado por la vía de señalización PKA-DARPP-32/PP1 (Flores-Hernández et al., 2002).

Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc que es parte fundamental en la regulación de los ganglios basales. La pérdida de los movimientos voluntarios se debe a un aumento en la actividad de la vía indirecta respecto a la vía directa (Figura 9) la cual provoca un aumento en la actividad de la SNr debido a la entrada glutamatérgica del STN lo que conlleva a la disminución de la actividad de las neuronas del tálamo las cuales ya no pueden ejercer un efecto estimulatorio sobre la corteza provocando de esta forma la inhibición del movimiento. (Alexander et al., 1990; Obeso et al., 2000).

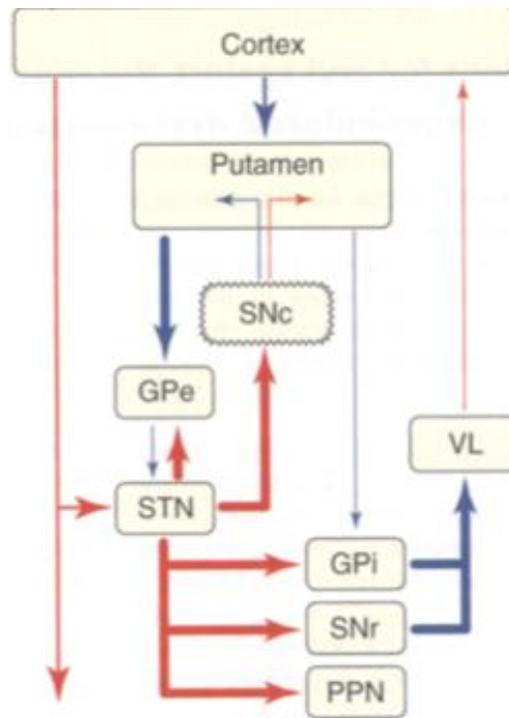


Figura 9.- Esquema de los Ganglios Basales en la enfermedad de Parkinson. En líneas rojas se representan las proyecciones Glutamatérgicas y en azules las proyecciones GABAérgicas, el grosor de las líneas indican el grado de activación de cada proyección. (Tomado de Obeso et al., 2000).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Aunque la enfermedad de Parkinson no tiene una cura, se tiene un tratamiento que reduce de forma significativa los síntomas de esta patología este tratamiento es la L-Dopa sin embargo como todos los fármacos no está exento de la aparición de reacciones colaterales en este caso es la aparición de las discinesias (Bezard et al., 2001). Esto conlleva a la búsqueda de blancos farmacológicos, o nuevas alternativas para contrarrestar los efectos colaterales de los tratamientos ya establecidos. Así pues el entendimiento del circuito de los ganglios basales y la dinámica funcional de las proteínas involucradas es fundamental para proponer nuevas estrategias farmacológicas.

Como ya he mencionado clásicamente existe una expresión diferencial de los receptores tipo D1 en la vía directa (estriato-nigral) y de los receptores tipo D2 en la vía indirecta. Sin embargo en la sustancia nigra pars reticulada que es el núcleo de salida de información más importante en los ganglios basales, se ha mostrado que en neuronas del estriado cuyas las proyecciones van a la nigra presentan expresión de ARNm de receptores D1 y D3 (Surmeier et al., 1996). Así mismo en nuestro laboratorio se ha observado en sinaptosomas de terminales nerviosas estriato-nigrales coinmunoprecipitación de los receptores D1 y D3 sugiriendo una interacción física tipo dimérica entre estos dos receptores (Cruz -Trujillo et al., 2012).

Al estar dimerizados, el receptor D3 potencia la formación AMPc inducida por los receptores D1 (Avalos-Fuentes et al., 2013). Este efecto del receptor D3 también se observa en la liberación de GABA estimulada por receptores D1 de las terminales estriato-nigrales, ya que en experimentos electrofisiológicos al ser estimuladas las neuronas con el agonista selectivo D3 (PD 128,907) y el agonista D1 (SKF 38393) hay un aumento en la frecuencia de los potenciales miniatura estimulados por la solo activación de receptores D1, sugiriendo la potenciación de los receptores D3 (Cruz-Trujillo 2012).

Los receptores D3 en el Núcleo Acumbens parecen estar bajo el control de la cinasa dependiente de calcio/cadmodulina tipo 2 (CaMKII) que en condiciones normales interactúa con el receptor D3, esto se ha demostrado en experimentos de coimmunoprecipitación, y resultado de esta interacción se bloquea al receptor D3 evitando sus efectos sobre la formación de AMPc (Liu et al., 2009). En las terminales estriado nigrales la CAMKII también regula la actividad del receptor D3 y cuando se activa en condiciones de despolarización previene la potenciación que el receptor D3 tiene sobre la liberación de GABA y la formación de AMPc.(Avalos-Fuentes et al., 2013).

En condiciones de denervación dopaminérgica (modelo de la enfermedad de Parkinson) curiosamente el efecto potenciador del receptor D3 sobre el receptor D1 observado en la liberación de GABA y en la formación de AMPc en condiciones normales ahora parece tener un efecto antagónico opuesto (Avalos-Fuentes et al., 2013). Lo que sugiere una pérdida de la función dimérica, sin embargo la coimmunoprecipitación persiste, lo que sugiere que los receptores siguen interactuando. También, en este modelo se encontró que CaMKII ya no coprecipitaba con el receptor D3 sugiriendo que la cinasa ya no modula este receptor (Avalos-Fuentes et al., 2013). Estos datos sugieren la necesidad de mayor experimentación a fin de dilucidar los cambios en la interacción de estos receptores en condiciones patológicas y que pueden ser importantes para la enfermedad de Parkinson.

Dentro de los receptores dopaminérgicos se sabe que el receptor D3 es el más afín a la dopamina, un solo gen codifica para este receptor, sin embargo por splicing alternativo se producen 7 variantes de este receptor incluyendo a la forma larga D3L y corta D3S ambas con afinidad a dopamina, y las 5 variantes restantes que no tienen afinidad por dopamina. La isoforma mal denominada no funcional: D3nf es la mejor caracterizada, esta variante carece de los dominios transmembranales VI y VII y se une a la forma larga D3 impidiendo que este se una a la dopamina e incluso re-direcciona la ubicación de la forma larga D3 de la membrana hacia el interior de la célula (Karpa et al., 2000; Richtand, 2006).

Una posible explicación por la cual la activación de receptores D3 en la denervación sean antagónicos a los receptores D1, puede ser la disminución en la expresión de la isoforma D3nf. En condiciones normales parte de los receptores D3 estarían dimerizando con los receptores D1, la otra parte se encontraría en el interior de la célula, dimerizando con la isoforma nf, la cual evitaría su aparición en membrana, por esto en condiciones normales solo se vería la acción de los dímeros D1/D3. En la denervación dopaminérgica la baja expresión de la isoforma nf, no secuestraría receptores D3 en el citoplasma y estos podrían ir a la membrana, ser activos y antagonizar a los dímeros D1/D3 que hubiera. Además podrían acoplarse a proteínas Gi y antagonizar los efectos de la activación de la adenilato ciclasa. La validación experimental de esta propuesta fue el objetivo del presente trabajo.

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la modulación de los receptores a dopamina en el modelo de ganglios basales es fundamental para buscar nuevas estrategias farmacológicas para enfermedades relacionadas con los circuitos motores como la fisiopatología de Parkinson.

HIPÓTESIS

La denervación dopaminérgica produce una disminución de la dimerización D3/D3nf, aumentando la expresión de receptores D3 en la membrana de las terminales estriado nigrales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Dilucidar la asociación de los receptores D3 y su isoforma D3nf localizados en terminales GABAérgicas en SNr en condiciones normales y de Parkinson experimental.

OBJETIVOS PARTICULARES

- En condiciones normales y de Parkinson Experimental:
 - Evaluar la expresión por medio de Western Blott de los receptores D1 y D3
 - Estudiar la expresión y distribución del receptor D3nf mediante inmunofluorescencia en rebanadas de cerebro de rata
 - Evaluar la sensibilidad y número de receptores D3 en las membranas de sinaptosomas de sustancia nigra por binding.

MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS EXPERIMENTALES

Para los estudios se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado entre 210-230 gr. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas en el bioterio a una temperatura entre 18° C y 23 °C con ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs. La alimentación y el agua fueron *ad libitum*.

LESIÓN UNILATERAL CON 6-HIDROXIDOPAMINA

A los animales se les indujo condiciones de Parkinson experimental a través de una lesión unilatera en la cual se inyectó 1 µl de 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 16 µg/µl disuelta en solución salina 0.9% con ácido ascórbico al 0.1%) que es una neurotoxina la cual provoca la muerte de las neuronas dopaminérgicas y es inyectada directamente en el haz del cerebro medio (MFB). Las ratas fueron previamente anestesiadas con una mezcla de Xilazina/Ketamina en una proporción de 3:1 respectivamente, posteriormente fueron colocadas en un esterotáxico (David Kopf) para la localización de las coordenadas correspondientes al MFB obtenidas del atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1986) a partir de bregma: -0.180 mm; anteroposterior, 0.240 mm lateral y -0.70 mm de profundidad. La inyección fue paulatina a una velocidad de 0.1 µl/min. Todos los sujetos fueron pretratados con desipramina para proteger el sistema noradrenérgico (Marien et. al., 2004).

PRUEBA CONDUCTUAL

8 días posterior a la cirugía los animales fueron sometidos a una prueba conductual en la cual se inyectó 10 mg/kg de metanfetamina para exacerbar el movimiento y corroborar el porcentaje de denervación (Ungerstedt et al., 1970). Todas aquellas ratas que hicieron más de 8 giros por minuto durante una hora fueron incluidas en los experimentos.

SOLUCIONES

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

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

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

Solución para el gel separador: Mezcla de 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 el gel concentrador: Mezcla de Acrilamida 30%, Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 10%, Persulfato de amonio PSA 10%, tetra metil-etil-diamida (TEMED) (0.0001%).

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

Buffer de Transferencia: Tris-Base (50 mM), Glicina (380 mM), MeOH 20%, SDS 0.1% pH 8.3.

Buffer de Muestra: Tris-Base (325 mM), Glicerol 50%, SDS 10%, 2-β mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0.5% pH 6.8.

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

RIPA-SDS: Tris-HCl (40 mM), NaCl (150 mM), EDTA (2mM), Glicerol 10%, Triton X-100 1

Buffer D3: 50mM Tris-HCL (pH7.4), 1mM EDTA, 5mM Mg⁺² Cl₂

OBTENCIÓN DE REBANADAS

Después de 8 días de haber realizado la prueba de conducta los animales fueron sacrificados por dislocación, se obtuvo el cerebro y se hicieron rebanadas coronales de 300 μm de espesor en el vibrátomo (CAMPDEN Instruments Ltd,

USA) para después disecar los núcleos estriados y SNr los cuales fueron colocados en una solución Krebs Normal.

Una vez obtenidas las rebanadas se realizaron dos procesos diferentes uno para obtención de sinaptosomas y otro para obtener las membranas de los núcleos.

OBTENCIÓN DE SINAPTOSOMAS

Una vez obtenidas las rebanadas de los diferentes núcleos se procedió a homogenizar el tejido 10 veces a una velocidad de 400 a 500 rpm en una solución HEPES-sacarosa (0.32M). El homogenado fue centrifugado a 800 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 a 7 °C. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a una centrifugación de 20 000 g durante 30 minutos. La pastilla fue recuperada (P1) y fue resuspendida en solución de HEPES-sacarosa (0.32M) después se colocó sobre una porción de HEPES-sacarosa (0.8M) y se volvió a centrifugar a 20 000 g durante 30 minutos, la fracción sinaptosomal o pastilla (P2) se resuspendió en RIPA-SDS junto a inhibidores de proteasas para los experimentos de Western blot.

OBTENCIÓN DE MEMBRANAS

Las rebanadas del estriado fueron homogenizadas en buffer para receptores D3 (50mM Tris-HCL (pH7.4), 1mM EDTA, 5mM Mg^{+2} Cl_2) dando 10 golpes en promedio a una velocidad de 500 rpm. Inmediatamente se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado y se hizo una segunda centrifugación a 20 000 g durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó la pastilla (P1) la cual fue resuspendida en el mismo buffer y se procedió a centrifugar nuevamente 30 minutos a 20 000 g a 4°C al terminar se recuperó la pastilla (P2) se resuspende en buffer D3 y es incubada durante 30 minutos a 37 °C para eliminar el ligando endógeno una vez transcurrido el lapso de tiempo se

colocó sobre una porción de gradientes de sacarosa compuesta por una parte al 55% y la otra al 30% para separar membranas pesadas y ligeras, luego es centrifugada a 58 000 g durante 3 horas, al término de la centrifugación se obtuvieron las fracciones membranales que se resuspenden en buffer D3 se centrifugaron a 20 000 g durante 35 minutos, se obtuvo la pastilla resuspendiendo en un volumen de 400µl con buffer D3 para su posterior uso en los experimentos de binding.

WESTERN BLOT

Para los experimentos de Western Blot los sinaptosomas fueron sonicados 3 veces y se procedió a realizar la cuantificación de proteínas por el método de Bradford a los sinaptosomas se les añadió dependiendo del volumen $\frac{1}{4}$ de buffer de muestra (4x). Las muestras fueron hervidas durante 10 min.

Las muestras hervidas fueron colocadas en un gel de poliacrilamida en una composición del 10% para detectar a los receptores D1 y D3, se cargo 35 µg de proteína por cada carril, éstas fueron sometidas a electroforesis a 60 mA durante una hora aproximadamente.

Una vez realizada la electroforesis el gel fue colocado en una cámara con buffer de transferencia exponiendo el gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada con metanol. La transferencia se realizó durante 3 horas a 180mA.

La membrana fue re-activada con metanol y con 3 lavados de 10 min con agua milli Q. Después fue bloqueada con leche al 7% libre de grasa durante dos horas a 4°C . Cuando se terminó el tiempo de bloqueo las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes que fueron disueltos en leche al 7% para el receptor D1 (Santa Cruz Biotechnologic) se incubo durante 10 horas a 4°C en una concentración 1:300. Para el receptor D3 (Santa Cruz Biotechnologic)

la incubación fue de 13 horas a 4°C en una concentración 1:300. Después se procedió a lavar las membranas con TBS-Tween al 0.1% (5x7 min.) para poder incubar los anticuerpos secundarios. Para el receptor D3 el anticuerpo secundario fue incubado durante 2 hrs. En una concentración 1:2000 a 4°C con agitación constante. Para el anticuerpo secundario del receptor D1 se realizó una dilución 1:2000 a una temperatura de 4°C con agitación constante.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% (4x7 min.) para colocar ECL-Plus (General electric) en la membrana durante 5 minutos, se realizó la exposición de la placa hacia la membrana en cuarto oscuro y después las bandas fueron visualizadas y analizadas por densitometría con el programa Image J a través de la siguiente fórmula :

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

INMUNOFLUORESCENCIA

Para los experimentos de inmunofluorescencia se utilizaron animales 8 días después de la prueba conductual los cuales fueron anestesiados con Ketamina/Xilazina 3:1 después se procedió a exponer la caja torácica, se ubicó el corazón y con una punta trunca se perforó para realizar la perfusión; se perfundió durante 30 minutos con PBS y masaje constante inmediatamente después se perfundió otros 30 minutos con Paraformaldehído al 4%.

El animal fue decapitado y se extrajo el cerebro que se preservó en una solución de sacarosa al 30% durante dos días. El cerebro fue lavado con PBS para realizar los cortes en el criostato a -20°C se hicieron cortes sagitales y coronales de 30 µm, para los coronales se hizo una pequeña incisión para marcar el lado lesionado, los cortes se colocaron en cámaras multiposos con solución de PBS filtrada.

Las rebanas se seleccionaron para ser lavadas con PBS filtrado , después se hirvieron las muestras con buffer de citratos durante 10 minutos , una vez hervidas son lavadas nuevamente y se les colocó solución de bloqueo con tritón para permeabilizar durante 30 minutos. Inmediatamente se realizaron lavados y se incubaron con el anticuerpo primario D3nf 1:50 (Santa cruz Biotechnology) el cual es disuelto en una solución de PBS con Albúmina 3% y asida de sodio 0.0001% durante 72 hrs como mínimo. Transcurrido el periodo se hicieron lavados con PBS para colocar el anticuerpo secundario Alexa Fluor 482 1:100 durante 2 horas se realizan los últimos lavados con PBS y se colocaron las rebanadas con delicadeza sobre un portaobjetos previamente gelatinizado, por último se colocó un cubre objetos y se sella la preparación con barniz para analizarse en el microscopio confocal (Leica).

BINDING

Se realizaron 8 concentraciones crecientes para el binding. El binding Total llevó un volumen de ensayo de 300µl (50 µl de tejido, 150 µl de ligando y 100 µl de buffer D3). La concentración del ligando (7-OH DPAT) fue de 7 nM. Para el Binding no específico se utilizó el mismo volumen de ensayo pero en presencia de 20µl de butaclamol (16 µM). Para el ligando total se utilizó 150µl del ligando + 12 ml de líquido de centelleo y por último para el blanco se utilizó 150µl de ligando y 150µl de buffer D3.

Cada uno de los ensayos se dejó reaccionar durante 2 hrs. Para después realizar una reacción de para utilizando papel filtro embebido en polietilamida al 3% en un filtrador al vacío. Las muestras fueron colectadas y se agregaron 12 ml de líquido de centelleo para colocarlas en un contador de centelleo líquido y realizar su análisis a través de Graphpad Prism v 6

RESULTADOS

Expresión de receptores D1 por Western Blot

Dentro de la denervación dopaminérgica existen cambios en la expresión de proteínas y se sabe que los receptores D1 se encuentran sensibilizados, además por medio de binding se ha demostrado que existe un número menor de receptores D1 en la membrana de la SNr (Rangel-Barajas 2008). Por lo cual se buscó si la expresión de las proteínas también se modificaba tanto en el estriado como en los sinaptosomas de la SNr de ratas hemiparkinsónicas.

Se encontró una menor expresión de los receptores D1 (Intacto: 116.7 ± 4.231 SEM; Denervado: 89.07 ± 5.052) con el análisis de densitometría tanto en el estriado como en los sinaptosomas de la SNr en el lado denervado en comparación con el lado intacto (Intacto: 99.51 ± 5.950 SEM; denervado: 71.98 ± 1.348) (Figura 10).

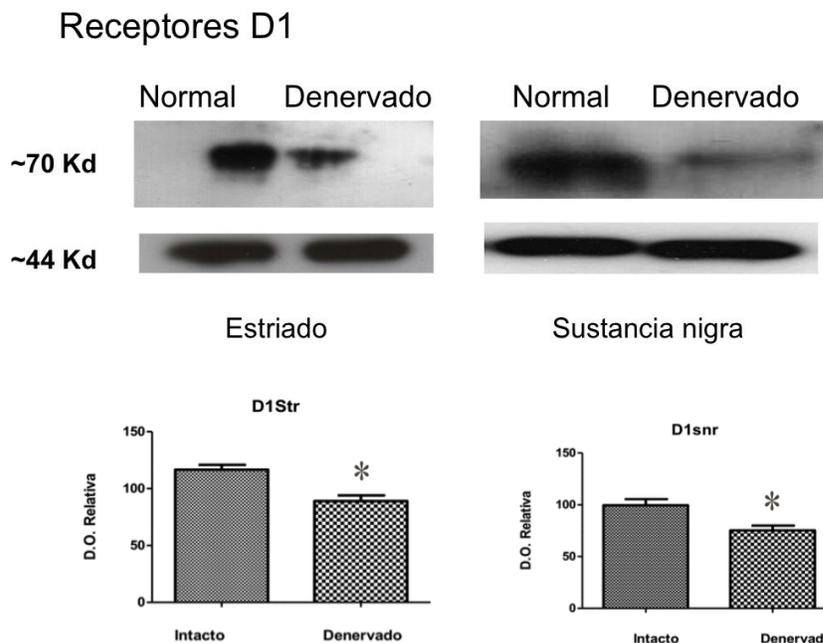


Figura 10.- Expresión de los receptores D1 por Western Blot. En la imagen superior se muestran los inmublotos representativos de los receptores D1 de lado superior izquierdo el correspondiente al estriado y de lado superior derecho al de la SNr. Las gráficas muestran la Densidad óptica relativa de los inmublot (N=3) se realizó una prueba de T de student con un intervalo de confianza del 95 %.

Expresión de receptores D3 por Western Blot

Se sabe que en la SNr el receptor D3 está ejerciendo un efecto inhibitorio en la formación de AMPc y liberación de GABA que en condiciones normales es el de potenciar tanto la liberación de GABA como la formación de AMPc inducida por los receptores D1 (Avalos-Fuentes et al., 2013). Sin embargo no se sabe que está pasando con la expresión de este receptor en estas condiciones, por lo cual es siguiente objetivo fue buscar como se encontraba la expresión de los receptores D3.

La expresión del receptor D3 se ve aumentada significativamente en condiciones de denervación (Figura 11) tanto en el estriado (Intacto: 52.73 ± 5.300 SEM; Denervado: 80.24 ± 5.081 SEM) como en la SNr (Intacto: 79.72 ± 7.612 SEM; Denervado: 79.72 ± 7.612 SEM) de la rata en comparación con el lado intacto.

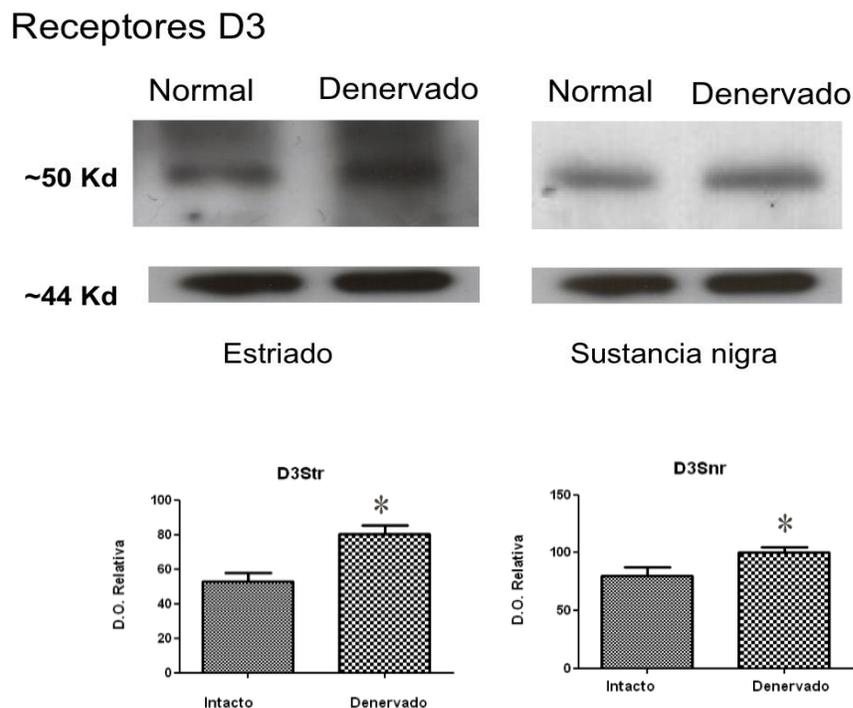


Figura 11.- Expresión de los receptores D3 por Western Blot. En la imagen superior se muestran inmuboblots representativos de los receptores D3 de lado superior izquierdo el correspondiente al estriado y de lado superior derecho al de la SNr. Las gráficas muestran la Densidad óptica relativa de los inmuboblots (N=3) se realizó una prueba de T de student con un intervalo de confianza del 95 %.

Distribución y expresión de la isoforma D3nf

A la isoforma D3nf se le ha atribuido una característica particular que es la de secuestrar de la membrana a la forma larga del receptor D3. Su expresión se ha observado en la corteza de monos teniendo una distribución citosólica. (Nimchinsky et al., 1997; Richtand, 2006). El objetivo de estos experimentos fue observar la distribución de la isoforma en el cerebro de la rata sí como su expresión por medio de inmunoreactividad en condiciones normales y de parkinson experimental. Los resultados nos muestran que la distribución en el estriado de la isoforma es citosólica además que se localiza agrupada en pequeños cúmulos (Figura 12). Así mismo la inmunoreactividad de la isoforma se encuentra disminuida tanto en el estriado como en la SNr en condiciones de denervación (Figura 13).

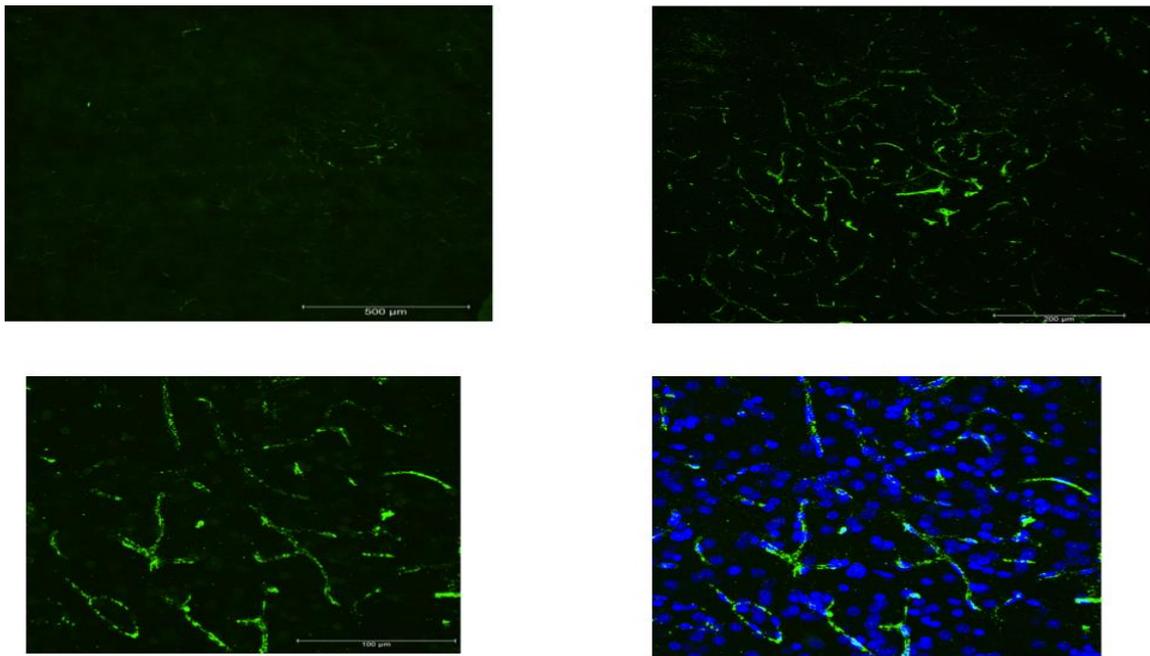


Figura 12.- Inmunofluorescencia de la isoforma D3nf en el estriado. Localización de la inmunoreactividad de la isoforma D3nf en cortes sagitales. La imagen superior izquierda se muestra una toma a 10x. En la imagen superior derecha se muestra una toma del estriado a 20X. La imagen inferior izquierda es un acercamiento de una región en la cual se observa mayor inmunoreactividad. Por último en la imagen inferior derecha se muestra un acercamiento de los cúmulos con doble tinción de la isoforma y el núcleo.

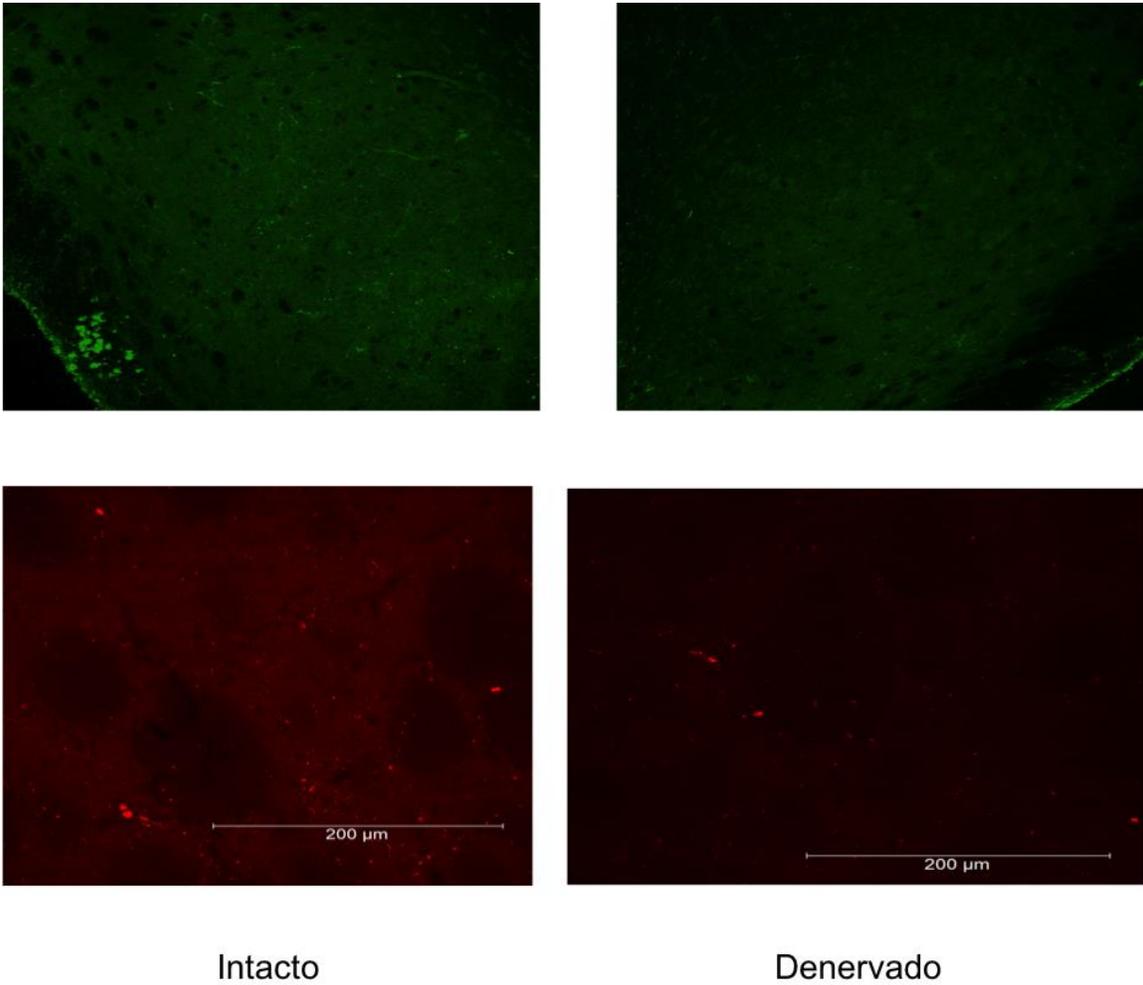


Figura 13.- Inmunofluorescencia de la isoforma D3nf. Panel de figura de cortes coronales representativos. La imagen superior izquierda muestra la inmunoreactividad a la isoforma D3nf en la SNr del lado intacto en una toma a 20x. La imagen superior derecha es una toma a 20x del lado lesionado en la SNr. La imagen inferior izquierda muestra una toma a 40X del estriado del lado intacto. Por último la imagen inferior derecha es una toma a 40X del lado lesionado del estriado.

Binding de membranas de receptores D3

El siguiente objetivo era saber si el aumento de la expresión del receptor D3 en condiciones de denervación que encontramos se debía a que existía un número mayor en la membrana que estaban siendo funcionales y debido a esto se observará un efecto inhibitorio en la formación de AMPc y liberación de GABA (Avalos-Fuentes 2013) por los que nos dimos a la tarea de realizar el Binding de membrana de los receptores D3 utilizando al agonista selectivo 7-OH DPAT.

Los resultados muestran que en condiciones de denervación existe un aumento en la Bmax de los receptores D3 en membranas del estriado respecto al lado intacto sin embargo la Kd no se modifica (Figura 14) esto sugiere que la actividad de los receptores está en función de la cantidad que se expresan en membrana y no en la afinidad (Intacto: $K_d = 3.9 \times 10^{-10}$ M; $B_{max} = 2164$ fmoles/ μ g; Denervado: $K_d = 3.73 \times 10^{-10}$; $B_{max} = 2842$ fmoles/ μ g).

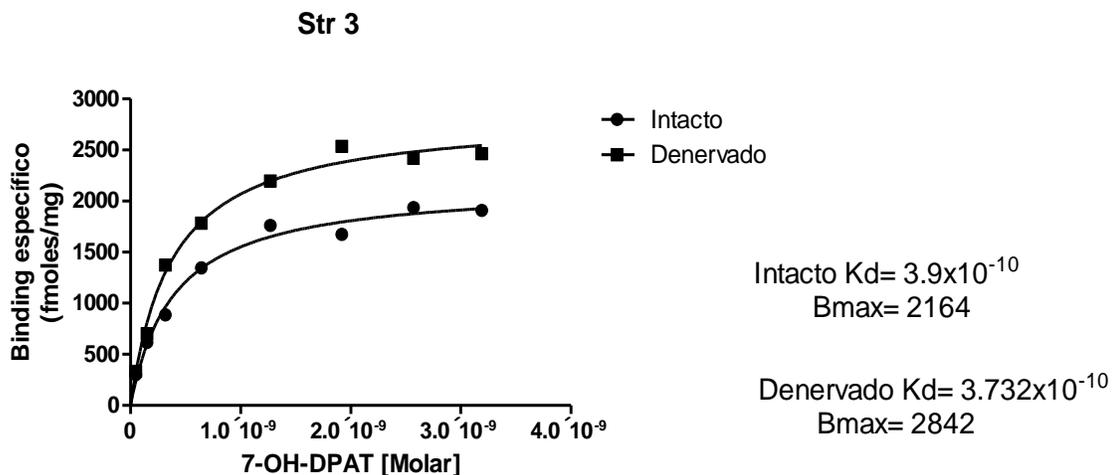


Figura 14.- Binding de membrana de los receptores D3. Gráfica representativa (n=3) de saturación en la que se muestra el Binding específico en condiciones intactas (círculos) y de denervación (cuadros). La Bmax se expresa en fmoles/ μ g de proteína y la Kd en concentración molar.

DISCUSIÓN

Es evidente la necesidad de proponer nuevas alternativas terapéuticas para enfermedades neurodegenerativas como es el Parkinson, aunque existe un tratamiento que ha logrado mantener un mejor calidad de vida de los pacientes (L-Dopa) no se encuentra exenta de manifestaciones colaterales como son las discinesias (Bezard et al., 2001). Por lo cual el grupo de trabajo del laboratorio ha buscado los aspectos celulares y moleculares que podrían ayudar a entender un poco más esta fisiopatología para proponer nuevos mecanismos que ayuden a complementar la terapia que se encuentra aún vigente.

Receptores D1

Se sabe que la actividad de los receptores D1 en condiciones de denervación se encuentra sensibilizado y que la activación de estos produce una un aumento en la liberación de GABA de la SNr (Floran et al., 1990; Rangel-Barajas 2008). Además que en esta sensibilidad de manera importante esta supersensibilizada la adenilato ciclasa V (Rangel-Barajas, 2011). Los resultados del western blot de los receptores D1 de este trabajo nos muestran una disminución en la expresión de la proteína en condiciones de denervación en el estriado respecto al lado intacto, sin embargo a pesar de ello existen supersensibilización tras su activación ya existen sistemas compensatorios como lo describe Rangel-Barajas (2008).

Respecto a los sinaptosomas de la SNr existe también una disminución en condiciones de denervación de la expresión de los receptores D1 esto concuerda con los resultados de binding de Rangel-Barajas en el cual demostró que en ratas hemiparkinsónicas en la SNr existe una disminución de la Bmax pero no de la Kd. (Rangel-Barajas et al., 2008).

Es importante señalar que posiblemente la disminución en la expresión de la proteína se correlaciona directamente del estriado hacia la SNr ya que la síntesis de los receptores D1 se encuentra principalmente en el soma del estriado y por transporte vesicular observamos una disminución en las terminales estriado-nigrales.

Receptores D3

Parte importante del proyecto era saber qué es lo que está pasando con los receptores D3 en condiciones de denervación. Como he mencionado existe un dímero D1-D3 en las terminales estriado-nigrales (Cruz-Trujillo et al., 2012) y que la coactivación de los receptores D1 y D3 se manifiesta en una potenciación de la liberación de GABA y formación de AMPc inducida por los receptores D1, incluso se sabe que la cinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo 2 (CAMKII) juega un papel de modulador del receptor D3 en el dímero (Avalos-Fuentes et al., 2013; Cruz-Trujillo et al., 2012). Esto puede deberse a que los receptores D3 estén modificando la afinidad de los receptores D1 en condiciones normales (Marcellino et al., 2008). Sin embargo en la denervación dopaminérgica ahora la coactivación de los receptores tiene un efecto contrario regresando a los niveles basales la formación de AMPc y liberación de GABA además que la CAMKII ya no está regulando la actividad del dímero (Avalos-Fuentes, 2013).

Los resultados nos muestran que existe un aumento de la expresión de los receptores D3 en el estriado como en las terminales de la SNr. Esto refuerza nuestra hipótesis acerca de un aumento en la señalización por parte del receptor D3 sin embargo estos resultados no nos indican si el aumento que observamos se deba a que los receptores D3 se encuentren en la membrana. Un hecho importante es que la expresión de los receptores D3 que se observa en los sinaptosomas de la SNr no son sólo provenientes de la vía estriado-nigral, reportes previos han mostrado la expresión del RNAm en neuronas del STN (Flores et al., 1999). Pero del total de las aferentes que llegan a la SNr solo el 10% provienen del STN

(Rinvik et al., 1993; Parent et al., 1995). Esto nos lleva a pensar el efecto que estamos viendo en su mayoría es de la vía estriado-nigral.

Isoforma D3nf

Respecto a la isoforma D3nf se ha observado en sistemas heterólogos secuestra a la forma larga del receptor D3 y lo lleva de la membrana a compartimentos citosólicos (Elmhurst et al., 2000; Ritchand, 2006). En este sistema hipotetizamos que la isoforma en condiciones normales mantiene secuestrada cierta población de receptores D3 en el interior de la célula y en condiciones de denervación la expresión se encuentre a la baja dejando libres a los receptores D3 y estos puedan traslocarse a la membrana y señalizar a través del acople a su proteína G α i. Esta alternativa explicaría en parte por qué ahora el efecto del receptor D3 en la formación de AMPc y liberación de GABA es antagónico al observado en condiciones normales (Avalos-Fuentes, 2013).

La distribución observada de la inmunofluorescencia para la isoforma D3nf en el estriado es citosólica y se localizan ciertos cúmulos muy definidos (Figura 12). La distribución concuerda con lo reportado en neuronas de la corteza de monos (Nimchinsky et al., 1997). Respecto a la inmunoreactividad en condiciones de denervación se muestra una disminución respecto a lado intacto tanto en el núcleo estriado como en la SNr esto apoya nuestra hipótesis, sin embargo aún falta esclarecer si las neuronas observadas son espinosas medianas haciendo doble tinciones con diferentes marcadores neuronales, así como buscar la interacción entre la isoforma D3nf y D3 en este sistema.

Binding de receptores D3 membranas

Una de las interrogantes del trabajo era saber que estaba pasando con los receptores D3 en las membranas, como hemos observado la expresión de la proteína aumenta tanto en el estriado como en la SNr de ratas hemiparkinsonicas. Además que la inmunoreactividad de la isoforma D3nf se encuentra disminuida en condiciones de denervación sin embargo no sabemos si el aumento en el western blot se relaciona con por un cambio en el número de receptores D3 en membrana o por un cambio en la afinidad.

Uno de los agonistas selectivos más utilizados para el receptor D3 es el 7-OH DPAT el cual fue utilizado para hacer los experimentos de Binding en las membranas del estriado. El resultado fue sorprendente al observar un cambio en condiciones de denervación respecto al lado no lesionado de la Bmax que aumentó, esto nos indica que el número de receptores en las membranas del estriado se encuentra incrementada, la Kd no se vio afectada en condiciones de denervación esto nos indica que la afinidad de los receptores permanece igual.

Los resultados concuerdan con lo encontrado en el western blot del receptor D3 en el estriado observando un aumento en la expresión de los receptores más el aumento en la Bmax de las membranas en la denervación.

En resumen en el trabajo encontramos que la expresión de los receptores D1 se encuentra disminuida tanto en el estriado como en la SNr y probablemente sean receptores que se encuentran en membrana con lo reportado por Rangel-Barajas en 2008. Qué existen regiones localizadas de la isoforma D3nf y se encontró una disminución de la inmunoreactividad en condiciones de denervación lo cual no está reportado hasta el momento.

Además que la expresión del receptor D3 se encuentra aumentada en el lado lesionado de la SNr y el estriado. Y el aumento de la Bmax en los experimentos de binding nos indica que el aumento observado en la expresión es protagonizado por los receptores que se encuentran en membrana.

Sin embargo estudios posteriores son necesarios. Las perspectivas inmediatas son realizar el Binding de los receptores D3 en la SNr, así como dilucidar la asociación de la isoforma D3nf con su forma larga y buscar si existe una colocalización de estas en los diferentes núcleos.

CONCLUSIONES

- Existe una disminución en la expresión de la proteína de los receptores D1 en el estriado como en las terminales de la SNr. de ratas hemiparkinsónicas
- Hay un aumento de la expresión de los receptores D3 tanto en el estriado como en los sinaptosomas SNr en condiciones de denervación
- La inmunoreactividad de la isoforma D3nf se encuentra localizada y es menor en condiciones de Parkinson experimental.
- En membranas del estriado de ratas lesionadas existe un aumento del número de receptores D3

Por lo que podemos concluir que existe una relación entre la disminución de la isoforma D3nf y el aumento de los receptores D3 en la vía directa.

REFERENCIAS

Albin, R. L., A. B. Young and J. B. Penney. "The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders." *Trends Neurosci* 12, no. 10 (1989): 366-75.

Alexander, G. E. and M. D. Crutcher. "Functional Architecture of Basal Ganglia Circuits: Neural Substrates of Parallel Processing." *Trends Neurosci* 13, no. 7 (1990): 266-71.

Andersen PH, Jansen JA." Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D1 receptor efficacy." *Eur J Pharmacol*. 1990 Jun 12;188(6):335-47.

Ariano, M. A. and D. R. Sibley. "Dopamine Receptor Distribution in the Rat Cns: Elucidation Using Anti-Peptide Antisera Directed against D1a and D3 Subtypes." *Brain Res* 649, no. 1-2 (1994): 95-110.

Arias-Montaña, J. A., B. Floran, L. Floran, J. Aceves and J. M. Young. "Dopamine D(1) Receptor Facilitation of Depolarization-Induced Release of Gamma-Amino-Butyric Acid in Rat Striatum Is Mediated by the Camp/Pka Pathway and Involves P/Q-Type Calcium Channels." *Synapse* 61, no. 5 (2007): 310-9.

Audinot, V., A. Newman-Tancredi, A. Gobert, J. M. Rivet, M. Brocco, F. Lejeune, L. Gluck, I. Desposte, K. Bervoets, A. Dekeyne and M. J. Millan. "A Comparative in Vitro and in Vivo Pharmacological Characterization of the Novel Dopamine D3 Receptor Antagonists (+)-S 14297, Nafadotride, Gr 103,691 and U 99194." *J Pharmacol Exp Ther* 287, no. 1 (1998): 187- 97.

Avalos-Fuentes, A., S. Loya-Lopez, A. Flores-Perez, S. Recillas-Morales, H. Cortes, F. Paz-Bermudez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran. "Presynaptic Camkiialpha Modulates Dopamine D3 Receptor Activation in Striatonigral Terminals of the Rat Brain in a Ca(2)(+) Dependent Manner." *Neuropharmacology* 71, (2013): 273-81.

Bar-Gad, I., G. Morris and H. Bergman. "Information Processing, Dimensionality Reduction and Reinforcement Learning in the Basal Ganglia." *Prog Neurobiol* 71, no. 6 (2003): 439-73.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR." The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." *Pharmacol Rev*. 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8.

Bevan, M. D., N. P. Clarke and J. P. Bolam. "Synaptic Integration of Functionally Diverse Pallidal Information in the Entopeduncular Nucleus and Subthalamic Nucleus in the Rat." *J Neurosci* 17, no. 1 (1997): 308-24.

Bezard, E., J. M. Brotchie and C. E. Gross. "Pathophysiology of Levodopa-Induced Dyskinesia: Potential for New Therapies." *Nat Rev Neurosci* 2, no. 8 (2001): 577-88.

Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli and E. Martignoni. "Functional Changes of the Basal Ganglia Circuitry in Parkinson's Disease." *Prog Neurobiol* 62, no. 1 (2000): 63-88.

Bolam, J. P., J. J. Hanley, P. A. Booth and M. D. Bevan. "Synaptic Organisation of the Basal Ganglia." *J Anat* 196 (Pt 4), (2000): 527-42.

Cicchetti F, Prensa L, Wu Y, Parent A. "Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Nov;34(1-2):80-101

Cruz-Trujillo, R., A. Avalos-Fuentes, C. Rangel-Barajas, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, E. Escartin-Perez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran. "D3 Dopamine Receptors Interact with Dopamine D1 but Not D4 Receptors in the Gabaergic Terminals of the Snr of the Rat." *Neuropharmacology* 67C, (2012): 370-378.

Elmhurst, J. L., Z. Xie, B. F. O'Dowd and S. R. George. "The Splice Variant D3nf Reduces Ligand Binding to the D3 Dopamine Receptor: Evidence for Heterooligomerization." *Brain Res Mol Brain Res* 80, no. 1 (2000):

Floran, B., J. Aceves, A. Sierra and D. Martinez-Fong. "Activation of D1 Dopamine Receptors Stimulates the Release of Gaba in the Basal Ganglia of the Rat." *Neurosci Lett* 116, no. 1-2 (1990): 136-40.

Flores-Hernandez, J., C. Cepeda, E. Hernandez-Echeagaray, C. R. Calvert, E. S. Jokel, A. A. Fienberg, P. Greengard and M. S. Levine. "Dopamine Enhancement of Nmda Currents in Dissociated Medium-Sized Striatal Neurons: Role of D1 Receptors and Darpp-32." *J Neurophysiol* 88, no. 6 (2002): 3010-20.

Flores, G., J. J. Liang, A. Sierra, D. Martinez-Fong, R. Quirion, J. Aceves and L. K. Srivastava. "Expression of Dopamine Receptors in the Subthalamic Nucleus of the Rat: Characterization Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Autoradiography." *Neuroscience* 91, no. 2 (1999): 549-56.

Gerfen, C. R. "The Neostriatal Mosaic: Multiple Levels of Compartmental Organization." *Trends Neurosci* 15, no. 4 (1992): 133-9.

Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. and D. R. Sibley. "D1 and D2 Dopamine Receptor-Regulated Gene Expression of Striatonigral and Striatopallidal Neurons." *Science* 250, no. 4986 (1990): 1429-32.

Gerfen, C. R., K. A. Keefe and E. B. Gauda. "D1 and D2 Dopamine Receptor Function in the Striatum: Coactivation of D1- and D2-Dopamine Receptors on Separate Populations of Neurons Results in Potentiated Immediate Early Gene Response in D1-Containing Neurons." *J Neurosci* 15, no. 12 (1995): 8167-76.

Gulcebi MI, Ketenci S, Linke R, Hacıoğlu H, Yanalı H, Veliskova J, Moshé SL, Onat F, Çavdar S. "Topographical connections of the substantia nigra pars reticulata to higher-order thalamic nuclei in the rat." *Brain Res Bull.* 2012 Feb 10;87(2-3):312-8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.11.005. Epub 2011 Nov 17.

Glase, S. A., H. C. Akunne, L. M. Georgic, T. G. Heffner, R. G. MacKenzie, P. J. Manley, T. A. Pugsley and L. D. Wise. "Substituted [(4-Phenylpiperazinyl)-Methyl]Benzamides: Selective Dopamine D4 Agonists." *J Med Chem* 40, no. 12 (1997): 1771-2.

Griffith, L. C. "Regulation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activation by Intramolecular and Intermolecular Interactions." *J Neurosci* 24, no. 39 (2004): 8394-8.

Hassani, O. K., C. Francois, J. Yelnik and J. Feger. "Evidence for a Dopaminergic Innervation of the Subthalamic Nucleus in the Rat." *Brain Res* 749, no. 1 (1997): 88-94.

Hernandez-Lopez, S., T. Tkatch, E. Perez-Garci, E. Galarraga, J. Bargas, H. Hamm and D. J. Surmeier. "D2 Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type Ca²⁺ Currents and Excitability Via a Novel Plc[β 1]-Ip3-Calcineurin-Signaling Cascade." *J Neurosci* 20, no. 24 (2000): 8987-95.

Karpa, K. D., R. Lin, N. Kabbani and R. Levenson. "The Dopamine D3 Receptor Interacts with Itself and the Truncated D3 Splice Variant D3nf: D3-D3nf Interaction Causes Mislocalization of D3 Receptors." *Mol Pharmacol* 58, no. 4 (2000): 677-83.

Khan, Z. U., A. Gutierrez, R. Martin, A. Penafiel, A. Rivera and A. De La Calle. "Differential Regional and Cellular Distribution of Dopamine D2-Like Receptors: An Immunocytochemical Study of Subtype-Specific Antibodies in Rat and Human Brain." *J Comp Neurol* 402, no. 3 (1998): 353- 71.

Lee KH, Chang SY, Roberts DW, Kim U. "Neurotransmitter release from high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus." *J Neurosurg.* 2004 Sep;101(3):511-7

Liu, X. Y., L. M. Mao, G. C. Zhang, C. J. Papasian, E. E. Fibuch, H. X. Lan, H. F. Zhou, M. Xu and J. Q. Wang. "Activity-Dependent Modulation of Limbic Dopamine D3 Receptors by Camkii." *Neuron* 61, no. 3 (2009): 425-38.

Marcellino, D., S. Ferre, V. Casado, A. Cortes, B. Le Foll, C. Mazzola, F. Drago, O. Saur, H. Stark, A. Soriano, C. Barnes, S. R. Goldberg, C. Lluís, K. Fuxe and R. Franco. "Identification of Dopamine D1-D3 Receptor Heteromers. Indications for a Role of Synergistic D1-D3 Receptor Interactions in the Striatum." *J Biol Chem* 283, no. 38 (2008): 26016-25.

Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC. "Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory." *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 Apr;45(1):38-78

McAllister, G., M. R. Knowles, S. M. Ward-Booth, H. A. Sinclair, S. Patel, R. Marwood, F. Emms, S. Patel, A. Smith, G. R. Seabrook and et al. "Functional Coupling of Human D2, D3, and D4 Dopamine Receptors in Hek293 Cells." *J Recept Signal Transduct Res* 15, no. 1-4 (1995): 267- 81.

McFarland, N. R. and S. N. Haber. "Convergent Inputs from Thalamic Motor Nuclei and Frontal Cortical Areas to the Dorsal Striatum in the Primate." *J Neurosci* 20, no. 10 (2000): 3798- 813.

Milligan, G. and M. A. Grassie. "How Do G-Proteins Stay at the Plasma Membrane?" *Essays Biochem* 32, (1997): 49-60.

Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron. "Dopamine Receptors: From Structure to Function." *Physiol Rev* 78, no. 1 (1998): 189-225.

Monsma, F. J., Jr., L. C. Mahan, L. D. McVittie, C. R. Gerfen and D. R. Sibley. "Molecular Cloning and Expression of a D1 Dopamine Receptor Linked to Adenylyl Cyclase Activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, no. 17 (1990): 6723-7.

Neve, K. A., J. K. Seamans and H. Trantham-Davidson. "Dopamine Receptor Signaling." *J Recept Signal Transduct Res* 24, no. 3 (2004): 165-205.

Nimchinsky, E. A., P. R. Hof, W. G. Janssen, J. H. Morrison and C. Schmauss. "Expression of Dopamine D3 Receptor Dimers and Tetramers in Brain and in Transfected Cells." *J Biol Chem* 272, no. 46 (1997): 29229-37.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. "Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease." *Trends Neurosci.* 2000 Oct;23(10 Suppl):S8-19.

Offermanns, S. "G-Proteins as Transducers in Transmembrane Signalling." *Prog Biophys Mol Biol* 83, no. 2 (2003): 101-30.

Parent, A. and L. N. Hazrati. "Functional Anatomy of the Basal Ganglia. I. The Cortico-Basal Ganglia- Thalamo-Cortical Loop." *Brain Res Brain Res Rev* 20, no. 1 (1995): 91-127.

Parent, A. and L. N. Hazrati. "Functional Anatomy of the Basal Ganglia. II. The Place of Subthalamic Nucleus and External Pallidum in Basal Ganglia Circuitry." *Brain Res Brain Res Rev* 20, no. 1 (1995): 128-54.

Penney JB Jr, Young AB. "Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders." *Annu Rev Neurosci.* 1983;6:73-94.

Rangel-Barajas, C., I. Silva, M. Garcia-Ramirez, E. Sanchez-Lemus, L. Floran, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran. "6-OHda-Induced Hemiparkinsonism and Chronic L-Dopa Treatment Increase Dopamine D1-Stimulated [(3)H]-Gaba Release and [(3)H]-Camp Production in Substantia Nigra Pars Reticulata of the Rat." *Neuropharmacology* 55, no. 5 (2008): 704-11.

Rangel-Barajas, C., I. Silva, L. M. Lopez-Santiago, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran. "L-Dopa-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats Is Associated with up-Regulation of Adenylyl Cyclase Type V/Vi and Increased Gaba Release in the Substantia Nigra Reticulata." *Neurobiol Dis* 41, no. 1 (2011): 51-61.

Ribak, C. E., J. E. Vaughn and E. Roberts. "Gabaergic Nerve Terminals Decrease in the Substantia Nigra Following Hemitransections of the Striatonigral and Pallidonigral Pathways." *Brain Res* 192, no. 2 (1980): 413-20.

Richtand, N. M. "Behavioral Sensitization, Alternative Splicing, and D3 Dopamine Receptor-Mediated Inhibitory Function." *Neuropsychopharmacology* 31, no. 11 (2006): 2368-75.

Richtand, N. M., Y. Liu, R. Ahlbrand, J. R. Sullivan, A. H. Newman and R. K. McNamara. "Dopaminergic Regulation of Dopamine D3 and D3nf Receptor Mrna Expression." *Synapse* 64, no. 8 (2010): 634-43.

Richtand, N. M., S. C. Woods, S. P. Berger and S. M. Strakowski. "D3 Dopamine Receptor, Behavioral Sensitization, and Psychosis." *Neurosci Biobehav Rev* 25, no. 5 (2001): 427-43.

Robinson, S. W., K. R. Jarvie and M. G. Caron. "High Affinity Agonist Binding to the Dopamine D3 Receptor: Chimeric Receptors Delineate a Role for Intracellular Domains." *Mol Pharmacol* 46, no. 2 (1994): 352-6.

Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K. "The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties." *Cell Mol Life Sci.* 2010 Jun;67(12):1971-86.

Seeman, P. and H. H. Van Tol. "Dopamine Receptor Pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* 15, no. 7 (1994): 264-70.

Smith, Y. and J. P. Bolam. "Neurons of the Substantia Nigra Reticulata Receive a Dense Gaba-Containing Input from the Globus Pallidus in the Rat." *Brain Res* 493, no. 1 (1989): 160-7.

Smith, Y., A. Charara and A. Parent. "Synaptic Innervation of Midbrain Dopaminergic Neurons by Glutamate-Enriched Terminals in the Squirrel Monkey." *J Comp Neurol* 364, no. 2 (1996): 231-53.

Sokoloff, P., B. Giros, M. P. Martres, M. L. Bouthenet and J. C. Schwartz. "Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dopamine Receptor (D3) as a Target for Neuroleptics." *Nature* 347, no. 6289 (1990): 146-51.

Surmeier, D. J., W. J. Song and Z. Yan. "Coordinated Expression of Dopamine Receptors in Neostriatal Medium Spiny Neurons." *J Neurosci* 16, no. 20 (1996): 6579-91.

Tepper, J. M. and J. P. Bolam. "Functional Diversity and Specificity of Neostriatal Interneurons." *Curr Opin Neurobiol* 14, no. 6 (2004): 685-92.

Tepper, J. M., L. P. Martin and D. R. Anderson. "Gaba_A Receptor-Mediated Inhibition of Rat Substantia Nigra Dopaminergic Neurons by Pars Reticulata Projection Neurons." *J Neurosci* 15, no. 4 (1995): 3092-103.

Ungerstedt, U. and G. W. Arbuthnott. "Quantitative Recording of Rotational Behavior in Rats after 6-Hydroxy-Dopamine Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System." *Brain Res* 24, no. 3 (1970): 485-93.

Utter, A. A. and M. A. Basso. "The Basal Ganglia: An Overview of Circuits and Function." *Neurosci Biobehav Rev* 32, no. 3 (2008): 333-42.

Van Tol, H. H., J. R. Bunzow, H. C. Guan, R. K. Sunahara, P. Seeman, H. B. Niznik and O. Civelli. "Cloning of the Gene for a Human Dopamine D4 Receptor with High Affinity for the Antipsychotic Clozapine." *Nature* 350, no. 6319 (1991): 610-4.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E, Galarraga E. "Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons." *Neuroscience*. 2000;95(3):745-52.

Wang, Q., J. P. Jolly, J. D. Surmeier, B. M. Mullah, M. S. Lidow, C. M. Bergson and J. D. Robishaw. "Differential Dependence of the D1 and D5 Dopamine Receptors on the G Protein Gamma 7 Subunit for Activation of Adenylylcyclase." *J Biol Chem* 276, no. 42 (2001): 39386-93.

Wickman, K. D., J. A. Iniguez-Lluhl, P. A. Davenport, R. Taussig, G. B. Krapivinsky, M. E. Linder, A. G. Gilman and D. E. Clapham. "Recombinant G-Protein Beta Gamma-Subunits Activate the Muscarinic-Gated Atrial Potassium Channel." *Nature* 368, no. 6468 (1994): 255-7.

Zapata, A. and T. S. Shippenberg. "D(3) Receptor Ligands Modulate Extracellular Dopamine Clearance in the Nucleus Accumbens." *J Neurochem* 81, no. 5 (2002): 1035-42.

Zeng, C., D. Wang, L. D. Asico, W. J. Welch, C. S. Wilcox, U. Hopfer, G. M. Eisner, R. A. Felder and P. A. Jose. "Aberrant D1 and D3 Dopamine Receptor Transregulation in Hypertension." *Hypertension* 43, no. 3 (2004): 654-60.

Zhang, F. L. and P. J. Casey. "Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences." *Annu Rev Biochem* 65, (1996): 241-69.

Zhuang, X., L. Belluscio and R. Hen. "G(Olf)Alpha Mediates Dopamine D1 Receptor Signaling." *J Neurosci* 20, no. 16 (2000): RC91.