

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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**Interacción de los Receptores Dopaminérgicos D₁-D₃ en el
Control de la Liberación de GABA y la Formación de AMPc
en la Sustancia Negra Reticulada de Ratas Normales y
Ratas con Parkinson Experimental**

T E S I S

Que presenta

M en C. JOSÉ ARTURO AVALOS FUENTES

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis

Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

México, D.F.

Octubre, 2013

INDICE

| | |
|-------------------|----|
| Resumen..... | 10 |
| Abstract..... | 12 |
| Introducción..... | 14 |

ANTECEDENTES GENERALES

| | |
|---|-----------|
| 1. CONTROL MOTOR..... | 17 |
| 1.1. Sistema Piramidal..... | 17 |
| 1.2. Sistema Extrapiramidal..... | 18 |
| 2. GANGLIOS BASALES..... | 18 |
| 2.1. Control Motor en los Ganglios Basales..... | 18 |
| 2.2. Organización Anatómica..... | 19 |
| 2.2.1. Estriado (Caudo-Putamen)..... | 20 |
| 2.2.2. Globo Pálido..... | 23 |
| 2.2.3. Núcleo Subtalámico (NST)..... | 24 |
| 2.2.4. Sustancia Negra..... | 24 |
| 2.2.4.1. Sustancia Negra compacta (SNc)..... | 25 |
| 2.2.4.2. Sustancia Negra reticulada (SNr)..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3. Organización Funcional de los Ganglios Basales..... | 26 |
| 2.3.1. Vía Directa..... | 28 |
| 2.3.2. Vía Indirecta..... | 28 |
| 3. SISTEMA DOPAMINÉRGICO..... | 30 |
| 3.1. Dopamina..... | 30 |
| 3.2. Síntesis y Liberación (exocitosis)..... | 31 |
| 3.3. Receptores para Dopamina..... | 34 |
| 3.3.1. Familia del tipo D ₁ | 34 |
| 3.3.2. Familia del tipo D ₂ | 36 |
| 3.4. Farmacología de Receptores Dopaminérgicos..... | 38 |
| 3.5. Señalización de Receptores Dopaminérgicos..... | 40 |
| 4. ENFERMEDAD DE PARKINSON..... | 47 |
| 4.1. Aspectos Celulares y Moleculares de la Enfermedad de Parkinson..... | 49 |
| ANTECEDENTES DIRECTOS | |
| 5. Receptores Dopaminérgicos D₃: Localización en los Ganglios Basales e Interacción con Receptores dopaminérgicos D₁ y la Calcio Calmodulina Cinasa tipo IIα (CaMKIIα)..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 6. JUSTIFICACIÓN..... | 57 |
| 7. HIPOTESIS..... | 58 |
| 8. OBJETIVOS..... | 58 |
| 8.1. Objetivo General..... | 58 |
| 8.2. Objetivos Particulares..... | 59 |
| 9. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 60 |
| 9.1. Sujetos Experimentales..... | 60 |
| 9.2. Pre-tratamiento con Reserpina..... | 60 |
| 9.3. Lesión Unilateral con 6-hidroxi-Dopamina..... | 61 |
| 9.4. Prueba Conductual (Prueba de Giro)..... | 61 |
| 9.5. Obtención de Sinaptosomas..... | 62 |
| 9.6. Estudios de Liberación de [³ H]-GABA..... | 63 |
| 9.6.1. Soluciones..... | 63 |
| Krebs-Henseleit Normal..... | 63 |
| Krebs-Henseleit alto potasio..... | 63 |
| 9.6.2. Obtención de las Rebanadas de la SNr..... | 63 |
| 9.6.3. Marca Radioactiva ([³ H]-GABA)..... | 64 |
| 9.6.4. Desarrollo Experimental..... | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 9.6.5. Fármacos Utilizados en Liberación de [³ H]-GABA..... | 65 |
| 9.6.6. Cuantificación de [³ H]-GABA Liberado..... | 66 |
| 9.7. Estudios de Formación de [³ H]-AMPC en los Sinaptosomas..... | 66 |
| 9.7.1. Incubación con Marca Radioactiva..... | 66 |
| 9.7.2. Activación de los Receptores en Sinaptosomas..... | 67 |
| 9.7.3. Separación del [³ H]-ATP y [³ H]-AMPC..... | 67 |
| 9.7.4. Cuantificación del [³ H]-ATP y [³ H]-AMPC..... | 68 |
| 9.7.5. Fármacos Utilizados en la Formación de [³ H]-AMPC..... | 68 |
| 9.8. Determinación de Proteínas por Western-Blot..... | 69 |
| 9.8.1. Fármacos Utilizados en la Activación de los Receptores en los Sinaptosomas..... | 70 |
| 9.9. Determinación de la interacción proteína-proteína por inmunoprecipitación..... | 71 |
| 9.10. Análisis Estadístico..... | 71 |
| 9.11. Estrategia Experimental..... | 72 |
| 10. RESULTADOS..... | 73 |
| 10.1. Ratas Normales..... | 73 |
| 10.1.1. Co-Expresión de Receptores Dopaminérgicos D ₁ y D ₃ en las Terminales Estriado-Nigrales..... | 73 |

| | |
|--|-----------|
| 10.1.2. La Activación de los Receptores D ₃ Incrementa la Formación de AMPc en Ratas Normales. Efecto Dependiente de la Activación de Receptores D ₁ | 75 |
| 10.1.3. El Incremento de Ca ⁺² Citoplásmico Inhibe la Potenciación de los Receptores D ₁ por los Receptores D ₃ | 77 |
| 10.1.4. Ca ⁺² Extracelular: Fundamental para la Regulación de la Interacción D ₃ -D ₁ | 80 |
| 10.1.5. La Despolarización Aumenta la Autofosforilación de la CaMKII α | 82 |
| 10.1.6. La Co-activación de los receptores D ₁ y D ₃ modula la autofosforilación de la CaMKII α | 83 |
| 10.1.7. La Potenciación de los Receptores D ₁ por los Receptores D ₃ en Liberación de GABA es Dependiente del Bloqueo de la CaMKII α | 85 |
| 10.1.8. La Activación de los Receptores D ₃ Aumenta la Respuesta de los Receptores D ₁ por sus Ligandos..... | 89 |
| 10.1.9. La Liberación de GABA Estimulada por la Co-Activación de Receptores D ₁ y D ₃ Depende de la Vía de Señalización AC/AMPc/PKA..... | 90 |
| 10.1.10. KN-62 Estimula la Liberación de GABA Modulada por la Dopamina Endógena..... | 93 |
| 10.2. Ratas Hemiparkinsonicas..... | 96 |
| 10.2.1. La Activación de Receptores D ₃ inhibe la Formación de AMPc Estimulada por Receptores D ₁ | 96 |
| 10.2.2. La Activación de Receptores D ₃ Inhibe la Liberación de GABA Estimulada por Receptores D ₁ , de Manera Dosis-Dependiente. Incremento en la Sensibilidad de Receptores D ₃ | 98 |

| | |
|--|------------|
| 10.2.3. El Efecto Inhibitorio de los Receptores D ₃ en el Parkinson Experimental se Encuentra a Nivel de la Adenilil Ciclasa..... | 99 |
| 11. DISCUSIÓN..... | 101 |
| 11.1. Co-expresión de Receptores D ₁ y D ₃ en Terminales Estriado-Nigrales..... | 101 |
| 11.2. Señalización Atípica de los Receptores D ₃ | 102 |
| 11.3. Modulación de la Actividad de Receptores D ₃ por la CaMKII α en las Terminales Estriado-Nigrales..... | 103 |
| 11.4. Los Receptores D ₃ , la Liberación de GABA y la Vía de Señalización AC/AMPC/PKA..... | 106 |
| 11.5. Incremento de la Afinidad de los Receptores D ₁ por los Receptores D ₃ | 108 |
| 11.6. Modulación de la Liberación de GABA Dependiente de la Interacción D ₃ /CaMKII α | 109 |
| 11.7. Efecto Inhibitorio de los Receptores D ₃ en el Parkinson Experimental..... | 110 |
| 12. CONCLUSIONES..... | 116 |
| Ratas Normales..... | 116 |
| Ratas Hemiparkinsónicas..... | 116 |
| 13. REFERENCIAS..... | 117 |
| ANEXO..... | 128 |

A B R E V I A T U R A S

| | |
|---------------|--|
| 6-OHDA | 6-Hidroxidopamina |
| AADC | Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos |
| AC | Adenilil Ciclasa |
| ADP | Adenosina Difosfato |
| AMPc | Adenosina Monofosfato cíclico |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| AVT | Área Ventral Tegmental |
| CaM | Calmodulina |
| CaMKII | Calmodilina cinasa tipo II |
| COMT | Catecol-O-Metil transferasa |
| DA | Dopamina |
| DAT | Transportador para dopamina |
| DYN | Dinorfina |
| ENK | Encefalina |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| GABA | Ácido γ -amino butírico |
| GABAT | Transaminasa de GABA |
| GB | Ganglios Basales |

| | |
|------------------------|--|
| GDP | Guanina Difosfato |
| GEF | Factor Intercambiador de Nucleótidos |
| GPCR's | Receptores acoplados a proteínas G |
| GP | Globo Pálido |
| GPe | Globo Pálido externo |
| GPi | Globo Pálido interno |
| GRK | Cinasas Reguladoras de GPCRs |
| GTP | Guanina Trifosfato |
| IBMX | Isobutil-metil-xantina |
| kD | Kilo Daltones |
| KO | Knock out |
| L-DOPA | L-Dihidroxifenilalanina |
| MAO | Monoamino oxidasa |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| NRT | Núcleo Reticular del Tálamo |
| NST | Núcleo Subtalámico |
| PI₃K | Cinasa-3 de Fosfoinositidos |
| PKA | Proteína Cinasa A |
| PKC | Proteína Cinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| RGS | Regulador de la Señalización de Proteínas G. |

| | |
|------------|-------------------------------|
| ROS | Especies Reactivas de Oxígeno |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNP | Sistema Nervioso Periférico |
| SNc | Sustancia Negra compacta |
| SNr | Sustancia Negra reticulada |
| SP | Sustancia P |
| TH | Tirosina Hidroxilasa |
| WB | Western Blot |

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson, es un desorden neurodegenerativo progresivo, que se caracteriza por la muerte de las neuronas de la sustancia negra compacta. Clínicamente, la enfermedad de Parkinson es un desorden motor, manifestado por bradicinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad postural. En la actualidad, la participación de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ presentes en los ganglios basales, ha sido estudiada exhaustivamente, tanto en una situación no patológica como en la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, el papel de los receptores D₃ es menos claro, y de hecho, fue el objetivo del presente trabajo. Los receptores D₃ forman parte de la familia de receptores dopaminérgicos del tipo D₂. En los ganglios basales, los receptores dopaminérgicos de ambas familias (tipo D₁ y tipo D₂), presentan una expresión diferencial, los receptores del tipo D₁ se expresan preferencialmente en la vía estriado-nigral, mientras que, los receptores del tipo D₂ se expresan preferencialmente en la vía estriado-palidal. Interesantemente, se ha mostrado que los receptores D₃, también se encuentran en la vía estriado-nigral co-expresados con los receptores D₁ en neuronas espinosas medianas del estriado. Este trabajo fue encaminado a entender el papel que juegan los receptores D₃ con los receptores D₁, en la vía estriado-nigral, tanto en condiciones normales como en el Parkinson experimental. Experimentos de inmuno-precipitación mostraron que los receptores D₃ y D₁ pudieran estar formando un hetero-dímero en las terminales estriado-

nigrales. Además, la activación de receptores D₃, fue capaz de modular la formación de AMPc y la liberación de GABA que es estimulada por receptores D₁, de manera diferencial; es decir, en ratas normales o en el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas, los receptores D₃ potencian los efectos generados por la activación de receptores D₁, mientras que, en el lado denervado de ratas hemiparkinsónicas, la activación de receptores D₃ antagoniza la respuesta ejercida por los receptores D₁. En ratas normales o en el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas, encontramos que el efecto potenciador se debe a un posible aumento de afinidad de los receptores D₁, ejercido por la activación de los receptores D₃. Aunado a esto, demostramos que la vía de señalización utilizada cuando se co-activaron ambos receptores es AC-AMPc-PKA. También encontramos que esta respuesta funcional se encuentra bajo la regulación negativa de la CaMKII. Esto indica que los procesos que incrementaron el influjo de calcio a la neurona regulan la interacción entre estos receptores. Los resultados mostrados también pudieron ser mimetizados por la presencia de dopamina endógena. En cuanto al lado lesionado encontramos que, los receptores D₃ son antagonicos a la respuesta ejercida por los receptores D₁, sobre la liberación de GABA y la formación de AMPc. En esta condición, la vía de señalización utilizada por los receptores D₃, es la inhibición de la adenilil ciclase. Estos datos sugieren que la interacción funcional de los receptores D₁ y D₃, se modifica significativamente durante la enfermedad de Parkinson, lo cual puede ser importante en el diseño de alternativas terapéuticas para el control de este padecimiento.

ABSTRACT

The Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by bradykinesia, rigidity, akinesia, abnormal posture and resting tremor. The irreversible loss of the dopamine-mediated control of striatal function is considered the functional substrate of the motor symptoms of Parkinson's disease and causes a complex rearrangement of neural activity of basal ganglia nuclei. Little is known about D₃ dopamine receptor, especially their role in the basal ganglia physiology. The aim of this work was to evaluate the D₃ receptor function, its relationship with D₁ receptors and their effects on GABA release and cAMP accumulation in normal rats and with experimental Parkinsonism. We found that D₃ and D₁ dopamine receptors are co-expressed in the same neuronal population, specifically in striato-nigral terminals. D₃ dopamine receptors enhance the response mediated by D₁ receptors on GABA release and cAMP accumulation, so we propose that this could be by a physical interaction between both receptors. Interestingly, we found that the signaling pathway on the enhancing effect is the AC-cAMP-PKA. The enhancing effect mediated by D₃ over D₁ receptors activation is under negative control of CaMKII, because process that increase intracellular calcium activated the kinase. The enhancing effect was unmasked in presence of endogenous dopamine too.

In the other hand, in rats with experimental Parkinsonism D₃ receptors inhibited the D₁ dopamine receptors effects on GABA release and cAMP accumulation. The inhibitory response by D₃ receptors activation was mediated by adenylyl cyclase inhibition. In this pathological condition D₃ receptors act as a classic inhibitory receptor. These data are important for the design of therapeutic management of Parkinson disease.

Introducción

Una de las actividades más importantes para los vertebrados en general, es la correcta ejecución del movimiento. Por esta razón, una de las actividades más interesantes que tiene el sistema nervioso central (SNC), es la de coordinar la correcta ejecución del movimiento, desde la más simple como puede ser la mueca en el rostro de cada uno de nosotros mostrando los diferentes estados de ánimo, hasta funciones más complejas como son caminar, correr, manejar, mantener el equilibrio. Actividades que exigen al máximo la perfecta coordinación del sistema nervioso central. Todo esto lo llevamos a cabo día a día sin preocuparnos por el más mínimo detalle de cómo sucede, hasta que nuestra coordinación motora se ve comprometida por algún tipo de patología. Por lo tanto, es importante para este proyecto estudiar y entender los aspectos moleculares que son importantes en el funcionamiento de los ganglios basales, que conlleva a la correcta coordinación y ejecución del movimiento.

Es bien sabido que, para la correcta ejecución y coordinación del movimiento, se encuentran involucradas varias estructuras cerebrales, dentro de las cuales se encuentran los Ganglios Basales (GB), así como también la liberación de ciertos neurotransmisores, como la dopamina (DA), que se encuentra jugando un papel muy importante dentro de esta regulación motora. La pérdida de dopamina a nivel central trae consigo una serie de patologías, como es la enfermedad de Parkinson, cuya

patología se ve reflejada por una dramática disminución del movimiento que, clínicamente, se conoce como bradicinesia. En la actualidad no se sabe con exactitud cuál es factor detonante de esta patología; sin embargo, se han visto relacionados tanto factores ambientales, como es el uso de pesticidas, herbicidas, químicos industriales, así como factores genéticos, dentro de los cuales destaca la mutación de proteínas como la α -sinucleína y la parkina.

En la actualidad, el tratamiento de elección para la enfermedad de Parkinson es la administración de L-DOPA, un precursor en la biosíntesis de la dopamina, razón por la cual se considera terapia de remplazo. Sin embargo, esta terapia farmacológica presenta una serie de efectos colaterales como son náusea, vómito, incontinencia urinaria y otros muy marcados, como son las discinesias inducidas por L-DOPA, que se presentan como consecuencia de la administración crónica esta terapia. Las discinesias se caracterizan por movimientos involuntarios que el paciente presenta en cara, cuello, manos. Lamentablemente éstas limitan de manera importante la calidad de vida del paciente.

Por lo tanto, es importante estudiar y entender los aspectos fisiológicos y moleculares de la enfermedad de Parkinson. Así como, la interacción entre receptores para dopamina. En este trabajo nos enfocaremos en los receptores dopaminérgicos D₁ y D₃, y en el control que estos ejercen sobre la liberación de ciertos neurotransmisores, que se verá reflejada sobre la actividad motora. Es importante mencionar que, la exploración de estos efectos funcionales fue llevada a cabo en los Ganglios Basales,

específicamente en la Sustancia Negra Reticulada (SNr), cuya participación en el control motor es de particular interés para este proyecto, ya que ésta al ser el núcleo de salida de los ganglios basales, se encuentra integrando la información proveniente de ambas vías que conforman a este circuito neuronal. Por lo tanto, es un núcleo vital para la regulación motora. Por esta razón es importante estudiar los cambios que se generan en los ganglios basales durante la enfermedad de Parkinson, con el fin de mejorar las estrategias farmacológicas que son dirigidas al tratamiento de esta enfermedad.

ANTECEDENTES GENERALES

1. Control Motor

El control motor es el resultado de la correcta integración de la información sensitiva y motora, dentro del sistema nervioso central, donde se lleva a cabo a través de sistema piramidal y el sistema extrapiramidal.

1.1. Sistema Piramidal: También llamado vía corticoespinal es un conjunto de axones motores que viajan desde la corteza cerebral (donde se encuentran las motoneuronas superiores) hasta las astas anteriores de la médula espinal (donde hace contacto con la motoneurona inferior). La vía corticoespinal contiene exclusivamente axones motores. Cerca del 90% de los axones se decusan (se cruzan) en el bulbo raquídeo (en el punto conocido como decusación de las pirámides). Las fibras motoras continúan hacia abajo dentro del tronco cerebral. El haz de axones corticoespinales es visible como dos estructuras en forma de columnas ("pirámides") en la cara ventral de

la médula espinal, de aquí viene el nombre de vía piramidal. Esto explica por qué los movimientos de un lado del cuerpo son controlados por el lado opuesto del cerebro.

1.2. Sistema extrapiramidal: Está constituido por las vías nerviosas polisinápticas que incluyen núcleos subcorticales como el cerebelo y los Ganglios Basales. Este sistema es llamado "extrapiramidal" para distinguirlo de los tractos de la corteza motora que viajan a través de las pirámides de la médula. Las proyecciones extrapiramidales nacen principalmente en la formación reticular del puente y el bulbo raquídeo, y sus neuronas diana en la médula espinal están relacionadas con los reflejos, la locomoción, los movimientos complejos y el control postural, complementando al sistema piramidal, que se encarga de los movimientos voluntarios principalmente. Los ganglios basales se encuentran participando principalmente en el control motor fino, a través de sus diversos núcleos de los cuales se conforma, lo que hace que este circuito neuronal sea de particular interés en este proyecto.

2. Ganglios Basales

2.1. Control Motor en los Ganglios Basales

Los ganglios basales participan en conductas motoras complejas que requieren de coordinación entre cognición, motivación y movimiento (Mink, 1996). La ejecución de movimientos voluntarios es el resultado del correcto procesamiento de la

información sensori-motora en el cerebro. Esta tarea es llevada a cabo por un amplio sistema neuronal, el cual incluye a la corteza cerebral, tálamo y ganglios basales.

El circuito neuronal que forman los ganglios basales se encuentra funcionalmente interpuesto entre la corteza cerebral y el tálamo. La principal tarea de este circuito es el procesamiento de las señales, que fluyen desde la corteza cerebral hacia los ganglios basales pasando por el tálamo y regresando a la corteza cerebral. De la corteza son enviadas a la médula espinal, para modular la ejecución del movimiento (Joel y Weiner, 1994).

2.2. Organización Anatómica

Los Ganglios Basales son un conjunto de núcleos que se encuentran localizados en la parte basal del telencéfalo, estos núcleos se encuentran conectados entre sí, formando un circuito neuronal. Estos núcleos son los siguientes: el caudo-putamen (estriado), el globo pálido, la sustancia negra y el núcleo subtalámico, están considerados generalmente como los principales componentes de los ganglios basales (Fig. 1,2). Algunos de estos núcleos se encuentran divididos en sub-núcleos. El Estriado se encuentra conformado por el núcleo caudado y putamen; el Globo Pálido o complejo palidal se compone por el Globo Pálido interno o medial (GPi) y Globo Pálido externo o lateral (GPe); Sustancia Negra, que a su vez se divide en Sustancia Negra reticulada (SNr) y Sustancia Negra compacta (SNc) (Bar-Gad et al., 2003; Blandini et al., 2000; Bolam et al., 2000).

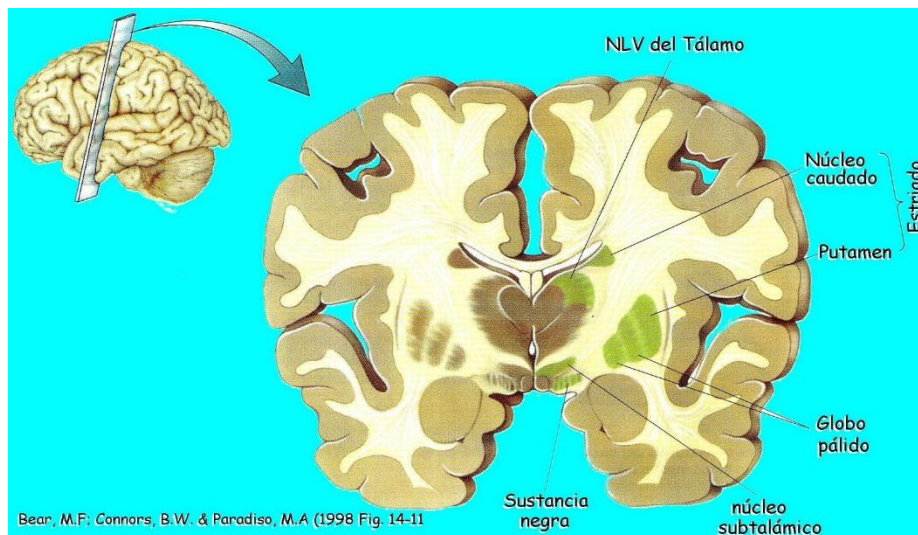


Fig. 1. Ubicación anatómica de los núcleos que conforman los ganglios basales. Corte coronal representando la ubicación de los ganglios basales en cerebro, conformados por Estriado, Globo Pálido (porción externa e interna), Núcleo Subtalámico y Sustancia Negra (porción compacta y reticulada) (Tomado de Bear et al., 1998).

El circuito neural de los ganglios basales se encuentra conformado por 2 vías: una vía directa y una vía indirecta. Ambas vías se encuentran procesando la información proveniente de la corteza, que posteriormente esa información regresa a la corteza a través del tálamo.

2.2.1. Estriado (Caudo-Putamen)

Es el núcleo de entrada de información a los ganglios basales así como también el más grande de éstos. Se encuentra dividido en estriado dorsal y estriado ventral. El estriado dorsal a su vez se divide en núcleo caudado y putamen en primates, ya que, en roedores se encuentra formado por una sola estructura llamada neostriado. El

estriado ventral, es una extensión ventral del estriado que incluye al núcleo accumbens y parte del caudado y putamen (Bar-Gad et al., 2003). El estriado recibe una importante y masiva entrada de glutamatérgica (excitatoria) proveniente de la corteza cerebral, otra entrada de naturaleza glutamatérgica proviene del tálamo (McFarland and Haber, 2000), y una tercera entrada pero de naturaleza dopaminérgica, llega al estriado desde la sustancia negra compacta y el área ventral tegmental (VTA) (Fig. 2) (Haber, 2000).

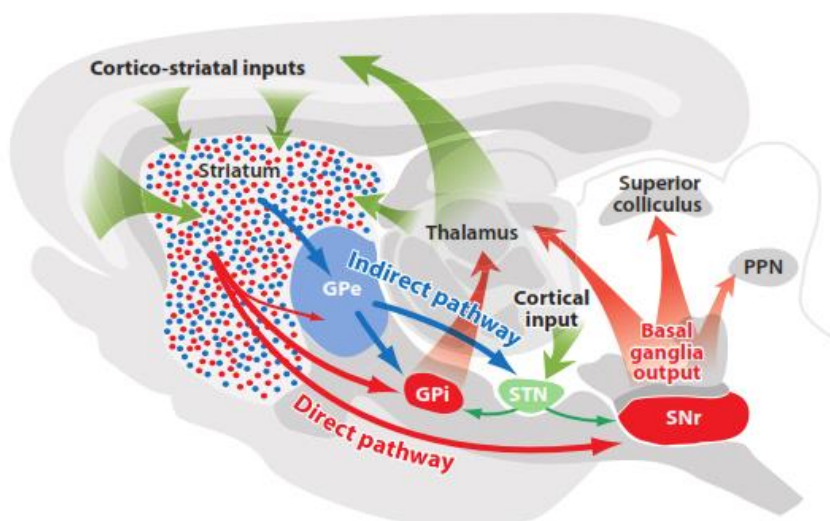


Fig. 2. Ubicación anatómica de los núcleos que conforman los ganglios basales. Corte sagital representando la ubicación de los ganglios basales en cerebro, conformados por Estriado, Globo Pálido (porción externa e interna), Núcleo Subtalámico y Sustancia Negra (porción compacta y reticulada). En rojo se muestra la vía directa, en azul la vía indirecta.

La mayor población de neuronas del estriado, aproximadamente un 95% están representadas por neuronas de proyección llamadas “espinosas medianas”, cuya de naturaleza es de origen GABAérgico. El 5% restante está conformado por interneuronas que pueden ser de naturaleza GABAérgica, colinérgica, parvalbumina y

somatostatinérgica (Blandini et al, 2000; Teper and Bolam, 2004). Como se mencionó anteriormente, las neuronas de proyección son de origen GABAérgico, por lo tanto, son neuronas de naturaleza inhibitoria. Las neuronas de proyección son capaces de dividirse en dos tipos, dependiendo del núcleo al que proyectan y del neuropeptido que co-liberan. Las principales estructuras que son blanco de las proyecciones del estriado son, el globo pálido y la sustancia negra reticulada (Parent and Hazrati, 1995). Se ha propuesto que las neuronas que contienen encefalina proyectan hacia el globo pálido, mientras que, las neuronas que contienen sustancia P (SP)/dinorfina proyectan hacia la sustancia negra reticulada (Gerfen, 1995). Esta segregación diferencial de las neuronas de proyección del estriado ha representado las bases para el modelo de los ganglios basales que actualmente se encuentra vigente, representando una vía directa y una vía indirecta. Otra característica diferencial que cabe resaltar en estas neuronas espinosas medianas, es la expresión de diferentes tipos de receptores dopaminérgicos, por ejemplo, en la vía directa se expresan preferencialmente receptores dopaminérgicos del tipo D₁, mientras que en la vía indirecta se expresan preferencialmente receptores el tipo D₂ (Gerfen, 1995; Surmeier, 1996). De manera importante, se ha mostrado que el receptor D₃ a pesar de formar parte de la familia de receptores del tipo D₂, que son receptores que se expresan en la vía indirecta, se ha encontrado asociada su expresión a la vía directa, es decir, se expresa en neuronas que expresan receptores del tipo D₁, en neuronas de proyección estriado-nigral, estando presente tanto en estriado (soma), como en sustancia negra

reticulada (Quirk et al., 2000; Surmeier et al., 1996; Gurevich et al., 1999; Ariano et al., 1994; Díaz et al., 1995).

2.2.2. Globo Pálido

También llamado complejo palidal, en primates el complejo palidal comprende dos segmentos (Blandini et al., 2000). La porción más lateral es llamada Globo Pálido externo (GPe), mientras que la porción que se localiza medialmente es llamada Globo Pálido interno (GPi), en roedores, el GPi se refiere al núcleo entopeduncular. Ambos segmentos del globo pálido reciben inervación GABAérgica (Utter and Basso, 2008), de las neuronas espinosas medianas (NEM) provenientes del estriado (Str). El globo pálido externo se encuentra conformado por neuronas de naturaleza GABAérgica (co-localizando con encefalina), por lo tanto, sus neuronas son de naturaleza inhibitoria. Las proyecciones del GPe viajan principalmente hacia el NST (Bevan et al., 1997) y SNr (Bolam, 2000), adicionalmente, también se han reportado proyecciones dirigidas hacia SNc, núcleo entopeduncular, núcleo pedúnculo pontino y núcleo reticular del tálamo (Parent and Hazrati, 1995b). Las neuronas palidales expresan preferencialmente receptores dopaminérgicos del tipo D4 (Ariano et al., 1997), estando presentes tanto en soma de neuronas palidales como en terminales presinápticas del NST (Flores et al., 1999) y de la SNr (Kahn et al., 1998). El GP aparte de recibir aferentes GABAérgicas provenientes del Str, también recibe aferentes de naturaleza dopaminérgica provenientes de neuronas de la SNr (Fig. 2). El GPe también

presenta expresión de receptores tipo D2, localizándose en las terminales estriado-palidales.

2.2.3. Núcleo Subtalámico (NST)

Es el único núcleo de naturaleza glutamatérgica dentro de los ganglios basales (Smith and Parent, 1998), por lo tanto, sus neuronas son excitatorias. Convencionalmente la ubicación del NST en los ganglios basales se encuentra en la vía indirecta. Las proyecciones del NST son enviadas primariamente hacia los núcleos de salida (SNr/GPi), pero también hay proyecciones hacia el GPe. Adicionalmente el NST envía proyecciones excitatorias hacia el Str, SNc y corteza motora (Parent and Hazrati, 1995b). El NST recibe aferentes de naturaleza GABAérgica provenientes del GPe y dopaminérgicas provenientes de la SNc (Hassani et al., 1997). Diferentes tipos de receptores son expresados en el NST, principalmente se encuentran los de tipo dopaminérgico, GABAérgicos y glutamatérgicos (Huntsman et al., 1996; Kultas-Ilinsky et al., 1998; Flores et al., 1999).

2.2.4. Sustancia Negra

Dos estructuras pueden ser reconocidas dentro del complejo Sustancia Negra: Una densamente poblada y pigmentada llamada Sustancia Negra compacta (SNc), y

otra adyacente, con una población celular menos densa, llamada Sustancia Negra reticulada (SNr).

2.2.4.1. Sustancia Negra compacta (SNc)

Una característica importante de estas neuronas es la presencia de melanina, por esta razón estas células se encuentran pigmentadas, siendo de naturaleza dopaminérgica. Prácticamente todos los núcleos de los ganglios basales son blanco de las proyecciones dopaminérgicas de la SNc (Str, GPe, NST, SNr) (Blandini et al., 2000; Utter and Basso, 2008), teniendo la dopamina (DA) un papel fundamental en la regulación motora a través de este circuito neuronal. Proyecciones hacia la SNc se originan desde varias estructuras, principalmente de origen GABAérgico, provenientes del estriado y globo pálido externo (Ribak et al., 1980; Smith and Bolam, 1989), así como también, provenientes de la SNr (Tepper et al., 1995). Aferentes glutamatérgicas hacia la SNc, provenientes de la corteza y NST han sido descritas (Bezard and Gross, 1998; Reese et al., 1995; Smith et al., 1996).

2.2.4.2. Sustancia Negra reticulada (SNr)

Localizada ventral y adyacente a la SNc, está compuesta de neuronas de naturaleza GABAérgica. Se considera el núcleo de salida de los ganglios basales junto con el globo pálido interno (GPi). La SNr envía proyecciones GABAérgicas (inhibitorias) principalmente hacia el tálamo, aunque también, otros blancos han sido descritos como el colliculo superior y el núcleo pedúnculo pontino (Parent and Hazrati, 1995b). La sustancia negra reticulada recibe inervación inhibitoria en su

mayoría (GABAérgica), proveniente del estriado a través de la vía estriado-nigral (Parent and Hazrati, 1995), del GPe por medio de las terminales pálido-nigrales (Smith and Bolam, 1989) y del núcleo accumbens (Deniau et al., 1994). Proyecciones glutamatérgicas hacia la sustancia negra reticulada son originadas en el núcleo subtalámico (Kita and Kitai, 1987). Como mencionamos anteriormente, la mayoría de la inervación que llega a la SNr es de tipo GABAérgica, teniendo diferentes fuentes: las terminales estriado-nigrales aportan aproximadamente un 40-45% de neuronas GABAérgicas, mientras que, las terminales pálido nigrales contribuyen con aproximadamente un 35-40%. Las proyecciones glutamatérgicas del NST contribuyen a la inervación de la SNr en aproximadamente 10% (Parent and Hazrati, 1995). La SNr al ser el núcleo de salida, se encuentra censando la información proveniente de ambas vías (estriado-nigral y pálido-nigral), por lo tanto, lo consideramos núcleo vital para el control motor.

2.3. Organización Funcional de los Ganglios Basales

El entendimiento de este circuito neuronal es relevante en la fisio-patología del movimiento. Evidencia anatómica, fisiológica y farmacológica ha dirigido a la formulación de un modelo que actualmente representa el funcionamiento del circuito de los ganglios basales (Fig. 3) (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990; Gerfen, 1992). Todos los núcleos que se mencionaron anteriormente, se encuentran

conectados entre sí, formando un circuito neuronal que procesa la información proveniente de la corteza. La información proveniente de la corteza, es procesada dentro de este circuito neuronal a través de 2 vías: **Vía Directa** y **Vía Indirecta**. El estriado se considera el núcleo de entrada de este circuito neuronal, mientras que, la sustancia negra reticulada es el núcleo de salida de los ganglios basales. La activación de ambas vías se lleva a cabo por medio de la dopamina, que es proporcionada a todo este sistema por neuronas de la sustancia negra compacta. La activación de ambas vías por la dopamina tiene como resultado un efecto sinérgico en la promoción del movimiento, a través de este circuito neuronal.

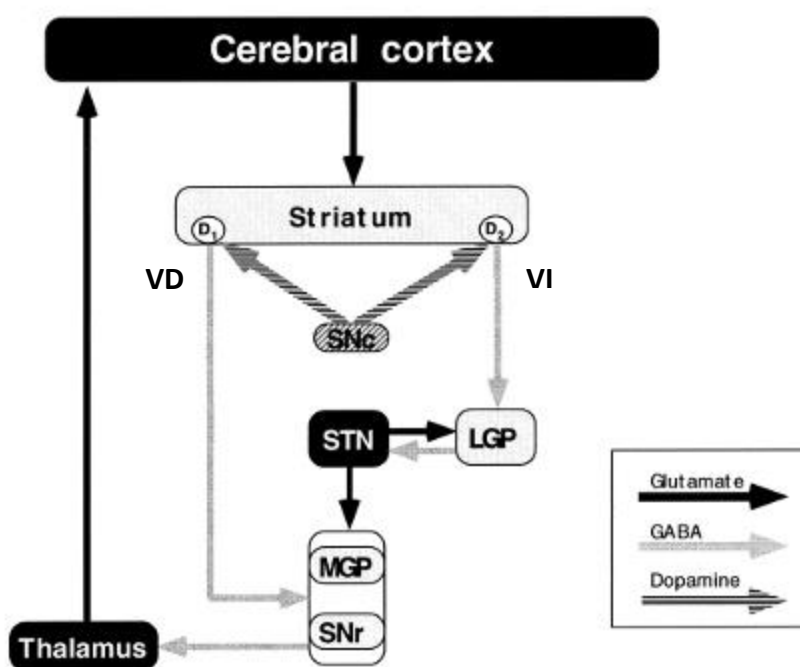


Fig. 3. Representación esquemática de la organización funcional del circuito de los ganglios basales. El estriado es el núcleo de entrada y la sustancia negra reticulada (SNr) es el núcleo de salida, se organizan en dos vías: la vía directa y la vía indirecta. En la vía directa el estriado manda proyecciones a la SNr (proyecciones estriado-nigrales); y en la vía indirecta, del estriado salen proyecciones al globo pálido externo (estriado-palidal) y tiene un relevo en el núcleo subtalámico (STN), donde posteriormente el STN envía proyecciones a la SNr. El estriado, la SNr y el globo pálido reciben inervación dopaminérgica de la sustancia negra compacta (SNc). VD, vía directa; VI, vía indirecta (Tomado de Blandini et al., 2000).

2.3.1. Vía Directa

La activación y flujo de información a través de esta vía, tiene como objetivo la facilitación del movimiento. Se considera vía directa, porque la información que llega al núcleo de entrada (Str), viaja directamente hacia el núcleo de salida (SNr), también es considerada como proyección estriado-nigral (ver fig. 3). Esta vía se compone de neuronas GABAérgicas (inhibitorias), que expresan preferencialmente receptores dopaminérgicos del tipo D₁ y que co-liberan sustancia P (SP) y dinorfina (Dyn). Evidencia creciente ha mostrado que además de receptores dopaminérgicos del tipo D₁, también se ha encontrado la expresión de receptores dopaminérgicos del tipo D₃ (Surmeier et al., 1996; Gurevich et al., 1999; Avalos-Fuentes et al., 2013), en esta vía. La activación de la vía directa inhibe al núcleo de salida (SNr). Esto produce la desinhibición del tálamo que se encuentra bajo el control inhibitorio de la SNr y con esto se promueve el movimiento, ya que el tálamo estimula la actividad cortical.

2.3.2. Vía Indirecta

Llamada así debido a que la información que sale del núcleo de salida (Str), hace relevo sináptico en dos núcleos más, antes de llegar al núcleo de salida. El primer relevo de información se lleva a cabo en el globo pálido externo (GPe), las proyecciones que llegan al GPe provenientes del Str son de naturaleza GABAérgica, estas proyecciones son conocidas como estriado-palidales, preferencialmente estas neuronas expresan receptores dopaminérgicos del tipo D₂ y co-liberan encefalinas. El

globo pálido externo manda eferentes GABAérgicas que hacen contacto sináptico con el NST, la SNr y el NRT. El NST envía sus proyecciones de naturaleza glutamatérgica hacia la SNr (subtálamo-nigrales). La activación de neuronas estriado-palidales causa la inhibición de GPe, que a su vez se encuentra inhibiendo al NST. Esto lleva a la desinhibición del NST y con ello al aumento de la actividad del núcleo de salida, resultando en la disminución del movimiento vía el tálamo (Alexander and Crutcher, 1990).

La dopamina es proporcionada a todo este sistema por neuronas de la sustancia negra compacta. La dopamina al activar a sus receptores produce un efecto sinérgico sobre estas dos vías para promover el movimiento, de acuerdo al modelo clásico de organización anatómico-funcional de los ganglios basales más ampliamente aceptado (Gerfen et al., 1992). Este modelo simple ha permitido resolver y explicar en gran medida los fenómenos que ocurren para el control motor fino, tanto en condiciones fisiológicas y patológicas como son la enfermedad de Parkinson y las discinesias inducidas por L-dopa. Sin embargo, los conocimientos más actuales sobre las relaciones sinápticas entre estas estructuras y otras recientemente estudiadas, hacen necesaria la reevaluación a futuro de este modelo básico como ha sido postulado por otros autores (Parent and Cicchetti, 1998; Bolam et al., 2000).

3. Sistema Dopaminérgico

3.1. Dopamina

Considerada dentro de las aminas biogénicas. Es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Además, se encuentra controlando una gran variedad de funciones incluyendo la actividad locomotora, cognición, emoción, reforzamiento positivo, ingesta de alimento y regulación endócrina, entre otras (Missale et al., 1998).

Esta catecolamina también juega múltiples funciones fuera del SNC, a nivel periférico como modulador de la función cardiovascular, secreción hormonal, función renal, motilidad gastrointestinal y tono vascular (Zeng et al., 2004). Además, se le ha puesto especial interés al sistema dopaminérgico por el hecho de que, en muchas condiciones patológicas como la enfermedad de Parkinson (EP), esquizofrenia, déficit de atención primaria con hiperactividad y síndrome de Tourette, se han reportado alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica.

Existen 3 principales sistemas de inervación dopaminérgica en el sistema nervioso central. El primer sistema es representado por el área ventral tegmental (AVT) que envía sus proyecciones al sistema límbico, como núcleo acumbens (NAcc) y algunas zonas de la corteza cerebral, áreas involucradas en emociones, cognición y de reforzamiento principalmente; el segundo es el núcleo arqueado, que envía sus

proyecciones principalmente a la pituitaria, involucrada en las funciones neuroendócrinas; y el tercer es la sustancia negra compacta (SNc), que envía sus proyecciones a los núcleos de los Ganglios Basales coordinando funciones motoras.

3.2. Síntesis y Liberación (exocitosis)

La síntesis de la dopamina se lleva a cabo en el soma y en terminales nerviosas dopaminérgicas. Esta es sintetizada a partir del aminoácido Tirosina, al cual se le añade un hidroxilo en posición “orto” formando el grupo catecol, por medio de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), para dar lugar a la formación de DOPA, este proceso enzimático es considerado como el paso limitante en la síntesis de la dopamina. La DOPA a su vez es descarboxilada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) para dar formación a la dopamina como tal (Fig. 4).

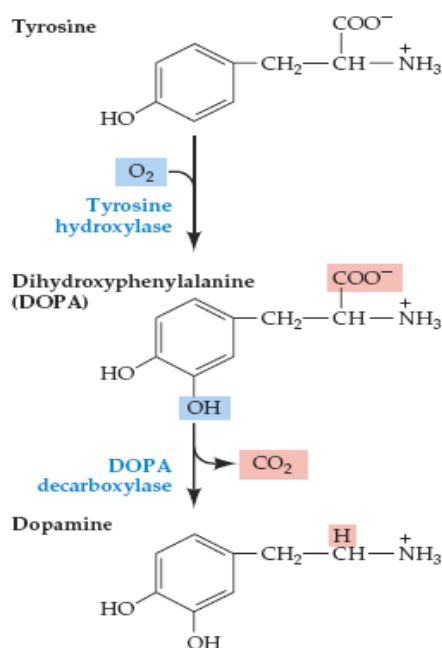


Fig. 4. Síntesis de la dopamina. La dopamina es sintetizada a partir de la tirosina, por medio de la TH se forma la L-DOPA, que posteriormente por acción de la AADC forma la dopamina, o seguir hasta la formación de noradrenalina por acción de la dopamina-β-hidroxilasa. TH, tirosina hidroxilasa. AADC, descarboxilasa de ácidos aromáticos.

Una vez que la dopamina ha sido formada, es transportada al interior de vesículas sinápticas por medio del transportador vesicular de mono-aminas (VMAT por sus siglas en inglés) para posteriormente ser liberada mediante un proceso de exocitosis (Fig. 5). La liberación de dopamina se da principalmente por mecanismos de exocitosis, mediante el arribo de un potencial de acción a la terminal presináptica se induce el influjo masivo de calcio (Ca^{+2}), teniendo como resultado la fusión vesicular y posteriormente la liberación del neurotransmisor al espacio extracelular. La regulación de la liberación de la dopamina esta mediada por autoreceptores y heteroreceptores.

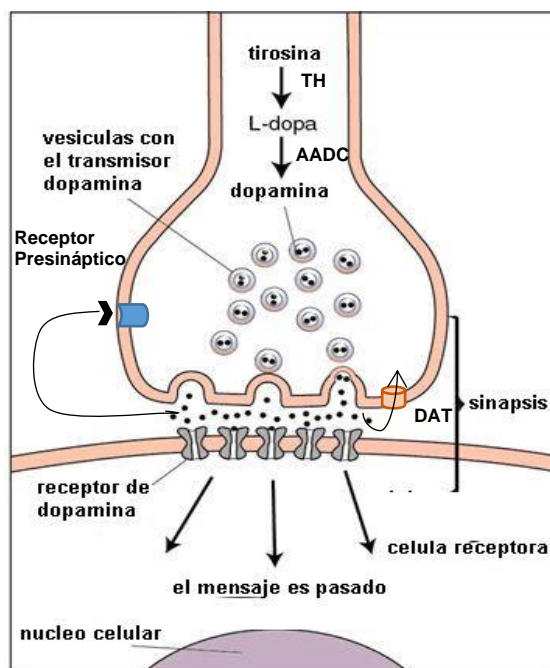


Fig. 5. Proceso de liberación de dopamina. La dopamina es sintetizada a partir de aminoácido tirosina, formando L-DOPA por acción de la TH y posteriormente formando DA por acción de la AADC. La DA es incorporada dentro de las vesículas, que posteriormente se fusionan a la membrana por el influjo de Ca^{+2} , para liberar la DA al espacio sináptico. La DA liberada actúa sobre receptores postsinápticos y presinápticos. Una parte de la DA es recapturada a la terminal por un transportador a DAT. La DA recapturada puede ser reincorporada de nuevo a las vesículas o degradada por la MAO. DAT, transportador de dopamina. TH, Tirosina Hidroxilasa. AADC, Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos.

Una vez que la dopamina es liberada al medio extracelular, activa a sus receptores correspondientes localizados pre o post-sinápticamente; otra parte de esta dopamina puede ser recapturada a la terminal que la liberó, por medio de transportadores membranales de dopamina (DAT's). La acción de la dopamina termina al ser degradada y las enzimas principalmente involucradas en el metabolismo de la dopamina son la monoamino-oxidasa (MAO) y la catecol-o-metil transferasa (COMT) (Fig. 6), dando como producto final ácido homovanílico (Cooper et al., 1996).

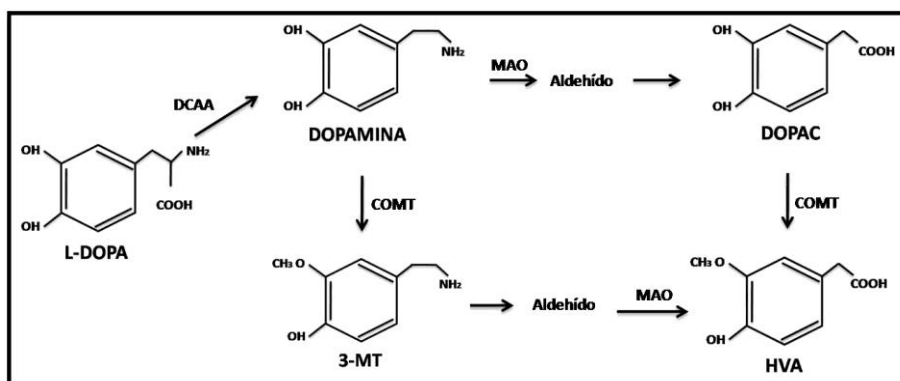


Fig. 6. Metabolismo de Dopamina. La dopamina es metabolizada por dos enzimas MAO y la COMT para ser convertida en 2 metabolitos principales DOPAC y ácido homovanílico (HVA)

3.3. Receptores para Dopamina

Los receptores para dopamina son GPCR's (receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas) de siete segmentos transmembranales (Fig. 7). Técnicas de clonación molecular han podido revelar la existencia de 5 subtipos de receptores para dopamina (D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅), estos receptores se encuentran agrupados en dos familias: la familia del tipo D₁ y la familia del tipo D₂, cuya clasificación depende de su capacidad para activar o inhibir a la adenilil ciclasa (AC), respectivamente (Missale et al., 1998). Los receptores para dopamina se encuentran expresados en el soma, dendritas y terminales de las neuronas que reciben innervación dopaminérgica.

3.3.1. Familia del tipo D₁

Esta familia se conforma por los receptores D₁ y D₅. Los receptores D₁ se componen de 466 a.a., mientras que los D₅ se componen de 477 a.a. Estos receptores comparten una alta homología en la secuencia de aminoácidos, aproximadamente del 80%, presentando la mayor diferencia en el carboxilo terminal, mientras que, en las asas intracelulares la secuencia de a.a. es altamente conservada entre ellos (Wang et

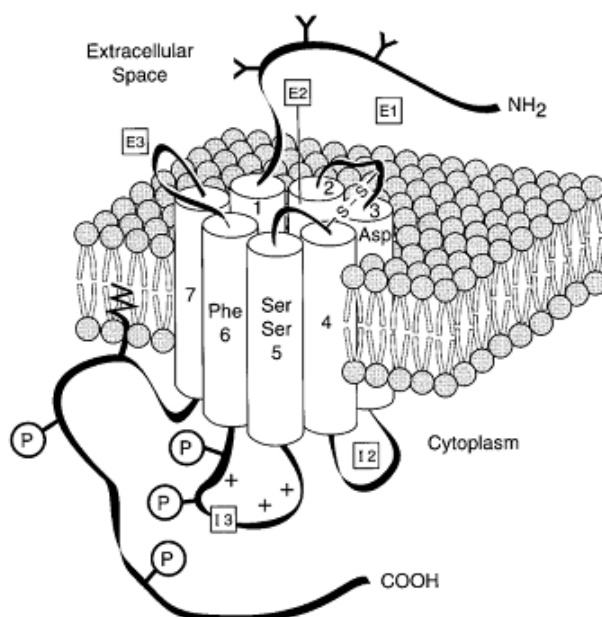


Fig. 7. Representación esquemática de los receptores para dopamina. Se conforman por 7 segmentos transmembranales que se acoplan a proteínas G heterotriméricas. Características estructurales de un receptor de la familia D₁-like. Los receptores de la familia D₂-like se caracterizan por tener el tercer loop intracelular más grande. Los sitios potenciales de fosforilación son representados por I₃ en el tercer loop intracelular (tomado de Missale et al., 1998).

al., 2001). Interesantemente éstos presentan una expresión diferencial a nivel del SNC. Los receptores del subtipo D₁, son los más ampliamente expresados en el SNC, encontrándose preferencialmente en el estriado, corteza cerebral, tubérculo olfatorio y Núcleo Accumbens, con menos expresión en la amígdala, hipotálamo y tálamo (Gringrich y Caron, 1993).

Los receptores de esta familia se caracterizan principalmente por su acople a proteínas G α_s . Zhuang et al. (2000), demostró que los receptores presentes en el estriado se acoplan de manera casi exclusiva a proteínas G α_{olf} , por lo tanto, la activación de estos estimula a la adenilil ciclasa que da como resultado una aumento

en la formación de AMPc. Como se mencionó previamente, los receptores de la familia 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 et al., 2000). La respuesta funcional como consecuencia de la activación de receptores D₁ en los ganglios basales, es el aumento en las corrientes NMDA a través de la vía DARPP-32-PP₁ (Flores-Hernández et al., 2002), y como efecto final la liberación de GABA (Florán et al., 1990), proceso dependiente del influjo de Ca⁺² a la neurona, por activación de canales de calcio del tipo P/Q (Arias-Montaña et al., 2007).

3.3.2 Familia del tipo D₂

La familia del tipo D₂ se encuentra conformada por los receptores D₂, D₃ y D₄. La respuesta en la activación de estos receptores esta mediada por su acople a proteínas G $\alpha_{i/o}$, por lo tanto, tienen la capacidad de inhibir a la adenilil Ciclasa, lo que conlleva a la disminución en la producción de AMPc. Los receptores subtipo D₂ se conforman por 443 a.a., existen dos isoformas para este subtipo, la denominada corta “D₂ short” (414 a.a.) y la larga “D₂ long” la cual tiene 29 a.a. más en la tercer asa intracelular (Uziel et al., 2000). La expresión de los receptores del subtipo D₂ se presenta de manera abundante en el estriado, en terminales estriado-palidales (neuronas que co-liberan encefalinas), en globo pálido (en su porción externa) y NST, así como en dendritas de la SNc (Missale et al., 1998).

Los del subtipo D₃ se encuentran conformados por 400 a.a. Recientemente se ha mostrado que los receptores D₃ tienen varias isoformas, dentro de las más importantes se encuentran, la forma larga llamada “D₃” y la forma corta llamada “D₃ short”, cuya diferencia entre ellos es de solo 21 a.a. en la tercera asa intracelular. Cinco isoformas más han sido caracterizadas para este receptor, las cuales no tienen la capacidad para unir dopamina, dentro de estas la más importante es la isoforma D₃nf, cuya característica principal es la capacidad para secuestrar receptores D₃ e impedir su señalización (Richtand, 2006; Elmhurts et al., 2000; Richtand et al., 2010; Karpa et al., 2000). Los receptores del subtipo D₃ se expresan principalmente en núcleo accumbens, islas de calleja, área ventral tegmental (AVT), SNc, GPi y SNr (en terminales que co-liberan SP). En previos estudios, se ha mostrado la presencia de cDNA para el receptor D₃ en putámen (Surmeier et al., 1996), así como también la presencia del receptor en el estriado y la SNr (Gurevich, 1999), lo cual sugiere que estos receptores están siendo sintetizados en el soma de neuronas estriado-nigrales y son enviados hacia la SNr encontrándose de forma pre-sináptica.

Finalmente, los del subtipo D₄ que consta de 419 a.a. Este receptor tiene 9 isoformas (Oak et al., 2000), se encuentran localizados a nivel del soma en el GPe, y de forma pre-sináptica en el NST, núcleo reticular del tálamo (NRT) y en la SNr (Missale, 1998). La respuesta funcional de la activación de estos receptores en las terminales pálido-nigrales, es la inhibición de la liberación de GABA (Acosta-García et al., 2009).

3.4. Farmacología de Receptores Dopaminérgicos

Las diferencias farmacológicas de estas dos familias de receptores están bien establecidas, sin embargo, cada receptor contenido en su correspondiente familia solo se diferencia de otro de la misma familia por la afinidad a los diferentes agonistas o antagonistas, muchos de los cuales recién comienzan a ser sintetizados y usados experimentalmente. Actualmente no ha sido posible diferenciar farmacológicamente a los receptores D₁ y D₅. La afinidad de estos receptores por antagonistas es muy similar, sin embargo el (+)-butaclamol presenta una afinidad un poco mayor por receptores D₁ que D₅ (Seeman and Van Tol, 1994). La afinidad de agonistas por estos dos receptores es casi idéntica. La diferencia más grande entre estos la hace la DA, que tiene 10 veces más afinidad por el receptor D₅ que por el D₁ (Missale et al., 1998). Para el caso de receptores de la familia D₂, los receptores D₂ y D₃ son los que muestran mayor similitud entre ellos y menor capacidad discriminativa hacia ciertos ligandos. La dopamina tiene aproximadamente 20 veces más afinidad por receptores D₃ que por D₂, esto ha sido relacionado a su secuencia diferencial en la tercer asa intracelular (Robinson et al., 1994), y hasta 70 veces más afinidad por el receptor D₃ que por el D₁ (Richtand et al., 2001). En los últimos 10 años se han desarrollado varios agonistas selectivos para receptores D₃, tal es el caso del PD 128,907 (Zapata and Shippenberg, 2002), 7-OH-DPAT y también del GR 103,691 como antagonista selectivo (Audinot et al., 1998). Entre los antagonistas para la familia del tipo D₂, el más conocido es el sulpiride, que muestra una afinidad más alta por el subtipo D₂/D₃ de 15 y 13 nM

respectivamente, mientras que exhibe muy baja afinidad por un D₄ de aproximadamente 1 mM. El haloperidol y la espiperona, por el contrario, muestran 10 y 20 veces más afinidad por el receptor D₂ que por el D₃, respectivamente. (-)-sulpiride, clozapine y raclopride no son capaces de discriminar entre estos dos tipos de receptores (Sokoloff et al., 1990). Para el receptor D₄, la característica más importante que lo diferencia del receptor D₂ y D₃, es su gran afinidad por la clozapina (Van Tol et al., 1991). Una característica principal de la familia D₂ es su gran afinidad por la apomorfina, característica que no presenta la familia D₁. Para el receptor D₄ ya se cuenta con agonistas selectivos como el PD 168,077 (Glase et al., 1997) y antagonistas como el L 745,870 (Patel et al., 1997).

| | D ₁ -Like | | D ₂ -Like | | |
|--------------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|
| | D ₁ | D ₅ | D ₂ | D ₃ | D ₄ |
| <i>Antagonists</i> | | | | | |
| (+)-Butaclamol | +++ | ++ | +++ | ND | ++ |
| Chlorpromazine | + | + | +++ | ++ | ++ |
| Clozapine | + | + | + | + | ++ |
| Eticlopride | - | - | ++++ | ND | +++ |
| Haloperidol | + | + | ++++ | ++ | +++ |
| Nafadotride | ND | ND | +++ | ++++ | +/- |
| Nemonapride | ND | ND | ++++ | ++++ | ++++ |
| Raclopride | - | ND | +++ | +++ | +/- |
| SCH-23390 | ++++ | ++++ | +/- | +/- | +/- |
| (-)-Sulpiride | - | - | ++ | ++ | ++ |
| Spiperone | + | +/- | ++++ | +++ | ++++ |
| <i>Agonists</i> | | | | | |
| Apomorphine | +/- | + | +++ | ++ | +++ |
| Bromocriptine | + | + | +++ | +++ | + |
| Dopamine | +/- | + | + | ++ | ++ |
| Fenoldopam | +++ | +++ | ++ | ND | + |
| 7-OH-DPAT | +/- | ND | ++ | +++ | +/- |
| Quinpirole | - | ND | +/- | ++ | ++ |
| SKF-38393 | +++ | ++++ | + | +/- | +/- |

++++, Inhibition constant (K_i) < 0.5 nM; +++, 0.5 nM < K_i < 5 nM; ++, 5 nM < K_i < 50 nM; +, 50 nM < K_i < 500 nM; +/-, 500 nM < K_i < 5 μ M; -, K_i > 5 μ M; ND, not determined; 7-OH-DPAT, 7-hydroxy-dipropylaminotetralin.

Tabla representativa de la farmacología de agonistas y antagonistas para los receptores dopaminérgicos (Tomado de Missale et al., 1998).

3.5. Señalización de Receptores Dopaminérgicos

Los receptores para dopamina pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 segmentos transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). Las proteínas G se conforman por 3 subunidades: α , β y γ . A su vez, la subunidad $G\alpha$ se encuentra dividida en 4 clases: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$. La subunidad $G\alpha$ se encuentra unida a la membrana por una modificación lipídica que puede ser miristilación o palmitilación (Zhang and Casey, 1996). Las subunidades $G\beta\gamma$ se encuentran formando un complejo no dissociable, uniéndose a la membrana plasmática por isoprenilación a través de la subunidad γ (Milligan and Grassie, 1997).

En estado basal, la subunidad $G\alpha$ 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 $G\alpha$ del complejo heterotrimérico, siendo reemplazado por GTP. La unión de GTP a la subunidad $G\alpha$ provoca un cambio conformacional que disocia el complejo heterotrimérico, separando la subunidad $G\alpha$ del complejo $G\beta\gamma$, teniendo estos diferentes efectores (Offermanns, 2003). La actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$ termina con el estado de activación de la proteína G, induciendo la re-asociación del complejo heterotrimérico, quedando unida de nuevo la subunidad $G\alpha$ a GDP y al complejo $G\beta\gamma$ (Fig. 8).

Como se mencionó anteriormente, la subunidad $G\alpha$ tiene 4 variantes, teniendo las distintas subunidades $G\alpha$ diferentes efectores:

- La subunidad G α_s , se acopla positivamente a la adenilil ciclasa, por lo tanto, incrementa la formación de AMPc.
- La subunidad G α_i/o , se acoplan negativamente a la adenilil Ciclasa, por lo tanto, inhibe la formación de AMPc.
- La subunidad G $\alpha_{q/11}$, activa a la Fosfolipasa C tipo β (PLC- β), por lo tanto, promueve la liberación de Ca⁺² de compartimentos intracelulares.

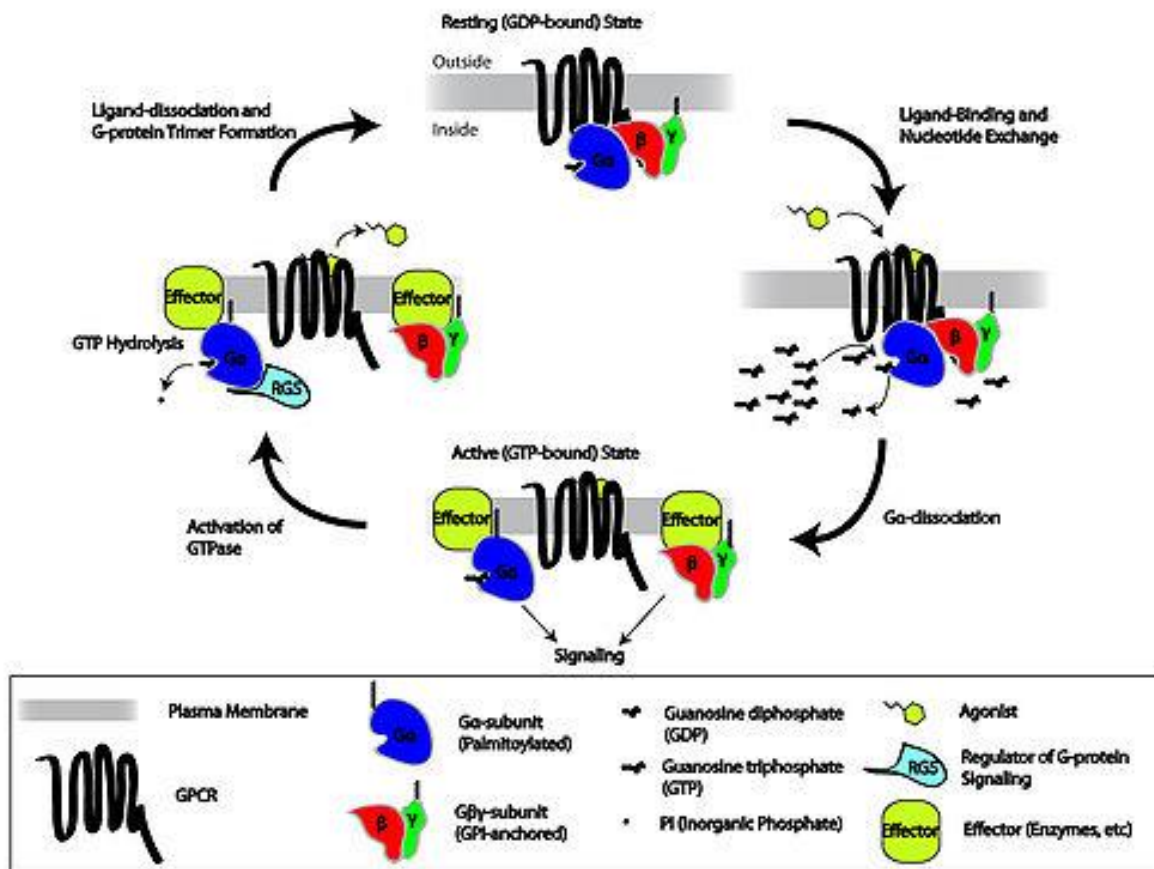


Fig. 8. Ciclo de activación-inactivación de proteínas G. En estado basal, la subunidad G $\beta\gamma$ se encuentra unida al igual que el GDP, a la subunidad G α . Al llegar el ligando, el GDP se disocia de la subunidad G α y es remplazado por GTP. La unión de GTP induce cambios conformacionales separando el complejo G α del G $\beta\gamma$, teniendo la libertad para activar a sus efectores. La re-asociación de ambos complejos se lleva a cabo cuando el GTP es hidrolizado por la subunidad G α y proteínas RGS, regresando al estado basal de la proteína G.

El complejo G $\beta\gamma$ generalmente ha sido considerado como el socio pasivo de la subunidad G α , sin embargo, este complejo juega un papel muy importante en la regulación de varios efectores. El mejor ejemplo es la regulación de canales rectificadores entrantes de K⁺ (GIRK) (Yamada et al., 1998), algunas isoformas de AC (Sunahara and Tausing, 1996), fosfolipasa C (PLC) (Exton, J.H. 1996), entre otros.

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 adenilil 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 ciertas proteínas que participan en la regulación de la expresión de genes (Fig. 9). 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 Ca⁺² 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 por sus siglas en inglés), DARPP-32 en estado fosforilado en el residuo treonina 34 (T₃₄), se

convierte 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).

El efecto de la activación de receptores D₁ puede disminuir, al activar alguna vía de señalización que tenga por función los incrementos de Ca²⁺ intracelular, ya que activa la proteína fosfatasa 2B (PP_{2B}) también llamada calcineurina, que desfosforila la DARPP-32 y por lo tanto se pierde la inhibición sobre la PP₁. Algunos otros reportes han vinculado la activación de receptores D₁ con la activación de vías involucradas en la sobrevivencia celular.

En estudios previos, se encontró que la activación de receptores D₁ induce la activación de vías de señalización antiapoptóticas, como es, la de la proteína cinasa B (PKB) más recientemente denominada AKT, y se encontró que la PKA puede fosforilar la AKT directamente lo que induce la fosforilación de CREB, un factor de transcripción que se transloca al núcleo favoreciendo el encendido de genes involucrados en la sobrevivencia celular (Brami-Cherrier et al., 2002). Otros estudios mostraron que, los receptores D₁ pueden acoplarse a proteínas G_{αq} y esto ocurre cuando está presente una proteína adaptadora denominada Calcyon (Fig.9), de esta manera la vía de señalización cambia y la activación de este receptor induce la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana (PIP₂), dando lugar a la formación de inositol tri-fosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) por activación de la fosfolipasa C (PLC), lo que conlleva a la

activación de los receptores a IP_3 en retículo endoplásmico y con ello induce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, por medio de esta vía también se activa la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (PKC) (Lezcano et al., 2000). Estudios previos han demostrado que la activación de receptores D1 en los ganglios basales facilita la liberación de GABA (Florán et al., 1990), proceso mediado por la vía de señalización AMPc/PKA (Arias-Montaño et al., 2007, Nava et al 2007).

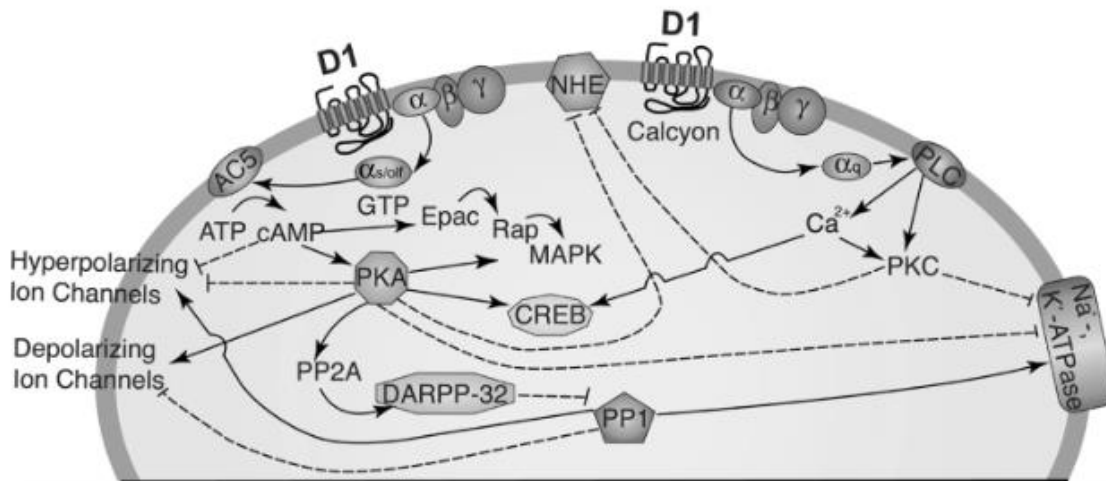


Fig. 9 Vías de Señalización de receptores tipo D1. La activación del receptor D1 incrementa la actividad de 3 principales vías de señalización: AMPc-PKA, MAPK y la vía de la PLC- IP_3 . Líneas completas indican activación de efectores. Líneas punteadas indican inhibición de efectores (Tomado de Neve et al., 2004).

Los receptores de la familia del tipo D2 (D2, D3 y D4), se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$, por lo tanto la activación de estos receptores inhibe la actividad de la adenilil ciclasa (McAllister et al., 1995). La consecuencia de la activación de estos receptores es la disminución en la formación de AMPc, y con ello no se lleva a cabo la activación de PKA, por lo tanto se disminuye la entrada de Ca^{+2} a la célula y con ello se evita la fusión vesicular a la membrana, disminuyendo la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico (Fig. 10). De hecho, clásicamente, todos los receptores del tipo D2 inhiben la actividad de canales de calcio L, N y P/Q, a través de proteínas G sensible a toxina pertusis.

La subunidad β/γ también puede estimular canales de K^+ rectificantes, datos experimentales mostraron que, la estimulación del receptor D2 disminuye la excitabilidad neuronal por incrementos en la corriente entrante de K^+ (Fig. 10). Todos los subtipos de receptores D2 activan canales rectificadores entrantes de K^+ regulados por proteínas G (GIRK), estos efectos presumiblemente son mediados por esta subunidad (Wickman et al., 1994).

Otro efector de la subunidad β/γ que se ha mostrado es la inhibición de corrientes de Ca^{2+} , en neuronas espinosas medianas (neuronas estriatales) se mostró que la activación de receptores D2 induce disminución de las corrientes de Ca^{+2} dependiente de canales tipo L (Fig. 10) (Hernández-López et al., 2000).

4. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo característico de la segunda mitad de la vida. Padecimiento tanto crónico como progresivo cuya característica principal es la pérdida de dopamina, esto por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta. La pérdida de dopamina en los ganglios basales trae consigo la disminución gradual en la capacidad de ejecución de movimientos voluntarios, esto por la potenciación de la activación de la vía indirecta (VI), sobre la vía directa (VD) (vía activadora del movimiento) (Alexander and Crutcher, 1990), provocando una exacerbada estimulación de la SNr proveniente del NST, que conlleva a una inhibición del tálamo y por lo tanto el tálamo no estimula a la corteza motora (Fig. 11). La manifestación clínica de esta enfermedad se da por tremor, rigidez y bradiscinesia (disminución de movimiento).

La causa de la pérdida de neuronas dopaminérgicas todavía está por ser esclarecida, aunque se ha sugerido que, esta patología pudiera ser causada por factores ambientales como exposición a pesticidas, herbicidas, químicos industriales, etc., que han sido asociados a fallas mitocondriales y por lo tanto generan la muerte neuronal. Así como también, factores genéticos que han sido atribuidos a mutaciones en la α -sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997), proteína que se encarga del transporte de la dopamina hacia el interior de las vesículas, y al de la Parkina (ligasa de ubiquitina) proteína encargada de dar la señal de degradación proteica mediada por proteosoma.

Ambos mecanismos, tanto ambientales como genéticos, parecen coincidir en la formación de especies reactivas a oxígeno (ROS), lo que dirige desorden del citoesqueleto que conlleva a la muerte neuronal por desacople del complejo I de la cadena respiratoria, así como también, al aumento en el proceso apoptótico de las neuronas (Coyle and Puttfarcken, 1993).

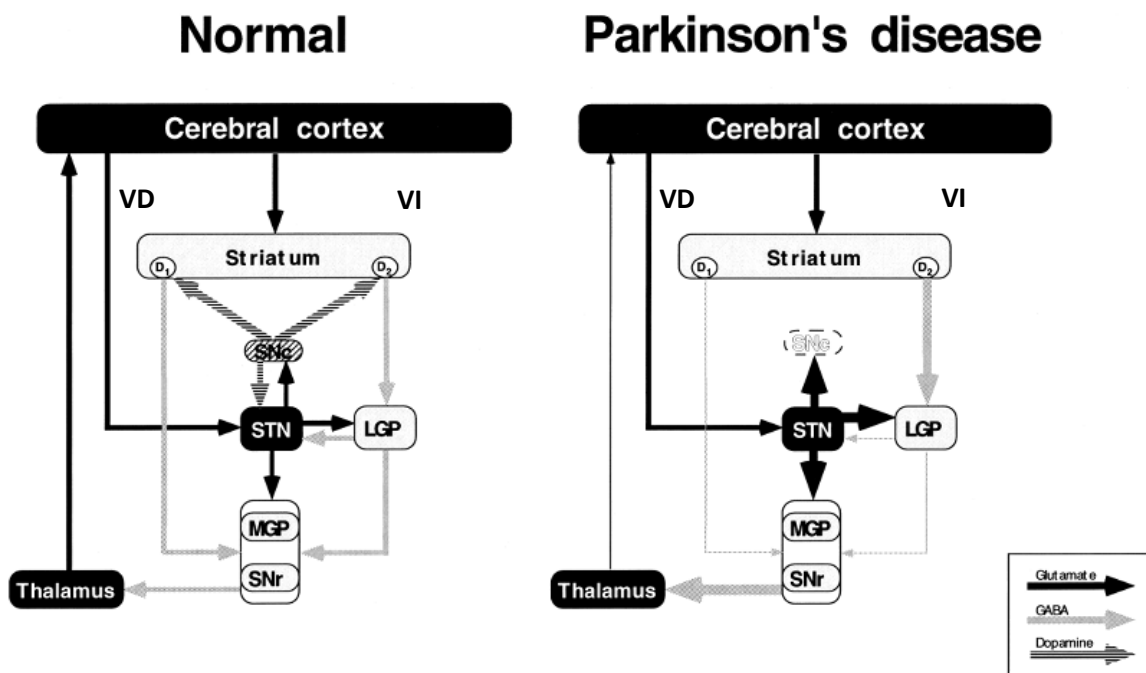


Fig. 11 Representación esquemática del circuito de los ganglios basales durante la enfermedad de Parkinson. En la imagen de la derecha se evidencian los cambios generados en los Ganglios Basales durante la enfermedad de Parkinson. Líneas delgadas indican disminución de la actividad de la vía. Líneas gruesas indican aumento en la actividad de la vía. En la enfermedad de Parkinson aumenta la actividad de la vía indirecta (Str-GPe), resultando en una exacerbada activación de la SNr. VD, vía directa; VI, vía indirecta (Tomado de Blandini et al., 2000).

4.1. Aspectos Celulares y Moleculares en la Enfermedad de Parkinson

Estudios recientes, han implicado una importante participación de los canales de calcio del tipo L dependientes de voltaje, en la patología de la enfermedad de Parkinson. Específicamente el subtipo Ca_v 1.3, que se ha asociado con la neurodegeneración de la sustancia negra compacta en adultos, y no en la versión juvenil de la enfermedad de Parkinson (Hurley et al., 2013; Chan et al., 2007). Chan y colaboradores (2009), posteriormente dieron a conocer que, la expresión de los canales Ca_v1.3 en la mitocondria la hacen más susceptible a la excitotoxicidad mediada por el calcio. Aunado a esto, pacientes que sufren de hipertensión y arritmias cardiacas, que han sido tratados con fármacos que bloquean a los canales Ca_v1, tienen un menor riesgo en presentar la enfermedad de Parkinson, lo que sugiere que el bloqueo de estos canales presenta un efecto neuroprotector (Becker et al., 2008; Ritz et al., 2010). La enfermedad de Parkinson genera una gran cantidad de cambios plásticos, uno de los más notorios es la supersensibilidad de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ (Caí et al., 2002). Caí y colaboradores (2002) mostraron que, los receptores dopaminérgicos D₂ supersensibilizan al aumentar su número, mientras que, los receptores D₁ supersensibilizan al aumentar la afinidad por su ligando. Por ejemplo, la activación de receptores D₁ aumentan aún más su respuesta funcional sobre la liberación de GABA en terminales estriado-nigrales, con respecto al lado que

no fue lesionado (Rangel-Barajas et al., 2008). Además, Rangel-Barajas y colaboradores (2010) demostraron que, la adenilil ciclasa aumenta su expresión en el lado lesionado de una rata hemiparkinsonica, tanto en el estriado como en la sustancia negra reticulada. Hasta la fecha, ningún tratamiento para la enfermedad de Parkinson es neuroprotectivo, y la enfermedad sigue su proceso. Algunos autores sugieren que la presencia de calcio puede ser dañino para la célula (Chan et al., 2009). Por lo tanto, es importante la presencia de proteínas que pueden mantener la homeostasis del calcio. Sin embargo, se ha reportado que la Calmodulina (CaM), una proteína que captura calcio, se encuentra disminuida su expresión en el Parkinson (Lessner et al., 2010; Pierson et al., 2004). En acuerdo con este último punto, también se han visto modificada una proteína que depende exclusivamente de la Calmodulina, la Cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII). Recientemente, se ha reportado que la actividad de esta CaMKII se encuentra disminuida, en un modelo de Parkinson en ratones (Moriguchi et al., 2012), lo que se ignora es sí, esta falta de actividad se debe a la disminución de la calmodulina ó, si la cinasa sufrió algún cambio que es dependiente de la enfermedad.

Muchos cambios plásticos se generan en la enfermedad de Parkinson, Napolitano y colaboradores (2002), mostraron que la denervación dopaminérgica genera la modificación de varios genes que participan en muchas funciones celulares, en particular, los que participan en la transducción de la señalización dopaminérgica y la transmisión glutamatérgica, en el estriado.

ANTECEDENTES DIRECTOS

5. Receptores Dopaminérgicos D₃: Localización en los Ganglios Basales e Interacción con Receptores dopaminérgicos D₁ y la Calcio Calmodulina Cinasa tipo II α (CaMKII α)

En la actualidad el tratamiento para la enfermedad de Parkinson continúa siendo un reto muy importante, sobre todo para mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Si bien es cierto que la L-DOPA es el tratamiento de elección para esta patología, no se encuentra exento de provocar efectos colaterales que llegan a limitar su uso, como es la aparición de discinesias (Bezard et al., 2001). Esto ha llevado a proponer una serie de alternativas potenciales que, aún se encuentran en estudio, o bien, están limitadas en su aplicación clínica. Es por ello que, se debe

continuar buscando nuevas alternativas terapéuticas basadas en un entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad, con el fin de modificar con las que ya se cuentan, o bien, proponer nuevas.

La acción de la dopamina dentro del control motor es por demás compleja, dada la extensa innervación de este tipo con que cuentan los ganglios basales y otras estructuras cerebrales. Sin embargo, desde el descubrimiento de la dopamina como neurotransmisor y sus receptores, dos sitios parecen ser claves en su acción: el estriado como sitio de inicio del proceso de modulación de la actividad motora y la sustancia negra reticulada y/o globo pálido interno como sitios de salida de la información en su retorno a la corteza motora. A nivel de la sustancia negra reticulada, el tono GABAérgico que esté presente determina la iniciación y la velocidad del movimiento planificado. La acción de la dopamina sobre la transmisión GABAérgica nigral es determinante para el control motor, por lo tanto, este control motiva a nuestro grupo de trabajo a tratar de entender los mecanismos por los cuales la dopamina controla ésta transmisión GABAérgica a través de sus receptores, tanto en condiciones normales como patológicas (enfermedad de Parkinson).

Las diferentes técnicas de clonación de los subtipos de receptores dopaminérgicos de ambas familias y las técnicas asociadas a ellas, mostraron que la distribución y subtipos de receptores asociados a las aferentes GABAérgicas que confluyen a la sustancia negra reticulada son más complejas. Así, se ha mostrado que receptores del tipo D₁ se encuentran expresados preferencialmente en neuronas

espinosas medianas que son positivas a dinorfina (Surmeier et al., 1996), es decir, de la vía directa, encontrándose expresados también en las terminales estriado-nigrales, donde se encuentran controlando de manera positiva la liberación de GABA (Florán et al., 1990). Por otro lado, otras aferentes nigrales como son las provenientes del globo pálido (terminales pálido-nigrales), presentan expresión de receptores dopaminérgicos del tipo D₄, donde la activación de estos regula de manera negativa la liberación de GABA (Acosta-García et al., 2009).

El papel de los receptores D₃ es menos claro y de hecho es el objetivo del presente trabajo. Curiosamente, se ha visto que el receptor D₃ a pesar de pertenecer a la familia de receptores de tipo D₂ (que son receptores que se expresan en la vía indirecta), su expresión ha sido asociado a la vía directa por diversos trabajos (Surmeier et al., 1996; Gurevich et al., 1999), donde ha sido reportada la presencia del mensajero para receptores D₃ en neuronas espinosas medianas que también expresan el mensajero para dinorfina, es decir, neuronas de proyección estriado-nigral (vía directa) (Surmeier et al., 1996). Aunado a esto, también se ha encontrado la presencia de la proteína correspondiente a estos receptores tanto en estriado como en sustancia negra reticulada (Gurevich et al., 1999) y núcleo subtalámico (Flores et al., 1999). Sin embargo, la carencia de RNAm para éste receptor en sustancia negra reticulada (Díaz et al., 1995), sugiere fuertemente que estos receptores estas siendo sintetizados en el soma de neuronas, tanto del núcleo subtalámico como del estriado, encontrándose en sustancia negra reticulada de manera presináptica, probablemente regulando la

liberación de neurotransmisores. Por lo tanto, es importante estudiar cual es el papel del receptor D₃ en las aferentes de la sustancia negra reticulada sobre la transmisión tanto glutamatérgica como GABAérgica, esta última de gran interés en este trabajo.

Interesantemente, los receptores D₃ pueden interactuar con una gran variedad de proteínas, siendo de particular interés para este trabajo, la que presenta con receptores D₁ (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008) y con la cinasa tipo II α dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII α) (Liu et al., 2009), que serán detalladas más adelante.

Acerca de los receptores D₁ y D₃, fuera del sistema nervioso central, se ha encontrado una asociación entre éstos, co-expresándose en células de túbulo renal proximal y en células de musculo liso de aorta de rata, donde se ha mostrado una interacción proteína-proteína entre estos receptores, por medio de estudios de inmunoprecipitación (Zeng et al., 2004).

Dentro del sistema nervioso central, en varios sistemas cerebrales ha sido encontrada una asociación entre receptores D₁ y D₃. Por ejemplo, en islas de Calleja se encuentran co-expresados estos receptores, pero sus efectos funcionales son antagónicos, mientras que, en núcleo Accumbens presentan efectos sinergistas (Ridray et al., 1998). Si bien esta interacción D₁-D₃ ya ha sido mostrada en estos sistemas, existen aún muchas controversias e interrogantes sobre su participación en el sistema de los ganglios basales, donde su esclarecimiento llevará a fundamentar un mejor abordaje en la terapia farmacológica de la enfermedad de Parkinson.

Recientemente se ha visto que en estriado, los receptores D₁ y D₃ son capaces de formar dímeros (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008), donde sus efectos funcionales son positivos, es decir, los receptores D₃ son capaces de aumentar la afinidad de los receptores D₁ por su ligando (Fiorentini et al., 2008), obteniendo una respuesta dopaminérgica más alta, mediada por receptores D₁. Así también, se ha mostrado que la actividad locomotora se ve incrementada en ratones mediante la co-activación de ambos receptores (Marcellino et al., 2008), muy probablemente por una vía de señalización exacerbada, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, también existen reportes que indican que los receptores D₃ pueden interactuar físicamente con la calcio Calmodulina Cinasa tipo II α (Liu et al., 2009). La calcio Calmodulina Cinasa II α (CaMKII α), es una serina-treonina cinasa que se encuentra ampliamente expresada en cerebro, especialmente en sitios donde ocurre la sinapsis (pre-sinápticamente o post-sinápticamente) (Kelly et al., 1984; Hudmon and Schulman, 2002). Esta enzima es removida de su estado auto-inhibitorio a un estado de activación, mediante la unión de Ca⁺² y Calmodulina (activación dependiente de Ca⁺² y Calmodulina). La CaMKII α no solo es capaz de fosforilar sustratos exógenos, sino que también puede auto-fosforilarse en la treonina 286 (T-286), presente en el dominio auto-regulatorio, consiguiendo así su completa activación, entrando a un estado de activación independiente de Ca⁺² y Calmodulina (Colbran and Brown, 2004; Hudmon and Schulman, 2002; Griffith et al., 2004). A través de interacciones proteína-proteína, la CaMKII α es capaz de regular diferentes tipos de

proteínas tanto en su expresión como en función. Recientemente se mostró que la CaMKII α puede interactuar físicamente con receptores D₃, es decir, receptores de tipo D₃ localizados en zonas límbicas (núcleo Accumbens) son sustratos directos de ésta. La unión de la Cinasa dependiente de Ca⁺² y Calmodulina a los receptores D₃, se presenta en la región N-terminal (amino terminal) de la tercera asa intracelular, dando como resultado de esta interacción física, la inhibición de la función de los receptores D₃ (Liu et al., 2009). Aunado a la interacción entre receptores D₃ y la CaMKII, reportes recientes han mencionado que la actividad de la CAMKII se ve modificada después de la denervación dopaminérgica (Moriguchi et al, 2012; Picconi et al., 2004).

Existe evidencia que sugiere que, los receptores D₃ pudieran tener una importante participación en la enfermedad de Parkinson, y que la sustancia negra reticulada puede jugar un papel fundamental en las acciones farmacológicas que sean dirigidas a esta patología. Sin embargo, los mecanismos celulares de la interacción entre receptores D₁ y D₃ no se conocen todavía, así como tampoco la interacción que pudieran tener los receptores D₃ con la CaMKII α , y la actividad de la CaMKII α después de la denervación dopaminérgica, por lo que nuestro proyecto está encaminado a contribuir en el entendimiento de estos procesos, y proporcionar un mejor abordaje en la terapia farmacológica de esta enfermedad.

6. Justificación

Hoy por hoy el tratamiento de elección para la enfermedad de Parkinson es la administración de L-dopa, que restaura y mejora la conducta motora; sin embargo, el problema se presenta durante la administración crónica, debido a la aparición de discinesias. Dentro de las alternativas terapéuticas para mejorar esta condición clínica, podría recomendarse el uso de fármacos con acción sobre receptores D₃ (Bezard et al., 2003). Por ello es importante estudiar el papel de los receptores D₃ ubicados en la sustancia negra reticulada, tanto en condiciones normales como en el Parkinson experimental, para validar adecuadamente su uso. En este proyecto pretendemos ahondar en estos mecanismos moleculares y de señalización, nos proponemos primordialmente estudiar el efecto que tiene la activación de los receptores D₃ y su interacción con los receptores D₁, sobre la liberación de GABA, la formación de AMPc así como la vía de señalización utilizada, esto en ratas normales y ratas con Parkinson experimental, así como también el papel que juega la cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII α) en la regulación de estos efectos funcionales antes descritos, dado que se ha mostrado que esta cinasa es capaz de modular los efectos de la activación de los receptores D₃.

7. Hipótesis

La activación de receptores D₃ potencia el efecto de la activación de receptores D₁ sobre la liberación de GABA y la formación de AMPc, en la sustancia negra reticulada de ratas normales, donde, la CaMKII α modula la respuesta de esta interacción.

En el Parkinson experimental, el efecto de la activación de receptores D₃ es de tipo antagónico, disminuyendo la liberación de GABA y la formación de AMPc estimulada por receptores D₁. El efecto inhibitorio de los receptores D₃ no es modulado por la CaMKII α .

8. Objetivos

8.1. Objetivo General

Estudiar el papel de los receptores D₃ y su interacción con receptores D₁ localizados en las terminales GABAérgicas de la sustancia negra reticulada, en condiciones normales (animales intactos) y en el Parkinson experimental (animales hemiparkinsónicos). Evaluación del efecto de la activación de la CaMKII α sobre la interacción D₃-D₁.

8.2. Objetivos Particulares

- Explorar la posible heterodimerización de receptores D₁ y D₃, en las terminales estriado-nigrales.
- Entender el papel del receptor D₃ y su interacción con el receptor D₁ en el control de la liberación de GABA y la formación de AMPc, en animales intactos y animales hemiparkinsonianos.
- Estudiar el efecto de la CaMKII α sobre el receptor D₃ y su interacción con el receptor D₁, sobre la liberación de GABA y la formación de AMPc en animales intactos y animales hemiparkinsonianos.
- Determinar la vía de señalización utilizada en estos efectos funcionales.
- Por Western Blot, estudiar el nivel de fosforilación de la CaMKII α , producido por la despolarización con KCl y por la activación de los receptores D₁-D₃.
- Determinar el tipo de canal de Calcio involucrado en la co-activación de estos receptores.

9. Materiales y Métodos

9.1. Sujetos Experimentales

Para todos los experimentos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con un rango de peso de 200-230 gramos, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas hasta la realización de los experimentos: Alimento y agua *ad libitum*, ciclos luz/oscuridad de 12 horas cada uno y temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

9.2. Pre-tratamiento con Reserpina

Las ratas que fueron utilizadas para los experimentos de liberación en ausencia de dopamina endógena de forma aguda, fueron tratadas con reserpina 16 horas antes de la realización del experimento. La reserpina fue disuelta en una solución con ácido láctico, quedando a una concentración de 10mg/kg de peso, la cual fue inyectada de forma subcutánea. Este proceso asegura una depleción del contenido de dopamina en la SNr de más del 90% (Nava et al., 2007).

9.3. Lesión Unilateral con 6-hidroxi-Dopamina

El modelo de Parkinson experimental utilizado fue el de lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), neurotoxina que selectivamente genera la muerte de neuronas dopaminérgicas, la cual fue inyectada directamente en el haz del cerebro medio (MFB). Las ratas se anestesiaron con una mezcla Ketamina/Xilacina (112.5/22.5 mg/kg, inyección intraperitoneal), una vez anestesiadas fueron colocadas en un aparato estereotáxico (Kopf; Tujunga, Ca. USA). Fueron localizadas las coordenadas del MFB, obtenidas del atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson, (1998), y se tomaron a partir de bregma: anteroposterior -0.180 mm; lateral 0.240 mm y profundidad de -0.700 mm., donde se realizó la infusión de $1 \mu\text{l}$ de 6-OHDA ($16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ disuelta en una solución de ácido ascórbico al 0.1%), durante 10 minutos ($0.1 \mu\text{l}/\text{min}$) en el lado derecho del cerebro de la rata. Todas las ratas que fueron lesionadas fueron sujetas a un pretratamiento con desipramina ($10 \text{ mg}/\text{kg}$ i.p.) 45 minutos antes de la lesión, para proteger al sistema noradrenérgico de la toxina.

9.4. Prueba Conductual (Prueba de Giro)

8 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 dieron 8 o más giros ipsilaterales (hacia el lado de la lesión) por minuto, fueron incluidas en los experimentos.

9.5. Obtención de Sinaptosomas

Se obtuvo el tejido de rebanadas de sustancia negra reticulada. Una vez obtenidas las rebanadas fueron sometidas a una homogenización (10 veces a una velocidad de 400-500 rpm) en una solución HEPES-sacarosa (0.32M). El homogenado se centrifuga a 800 G durante 10 minutos a una temperatura de 4-7 °C. Se recupera sobrenadante y se somete a ultra-centrifugación a 20, 000 G durante 20 min. Se recupera la pastilla (P1) y se resuspende en el mismo buffer sacarosa (0.32M) que se coloca sobre una solución HEPES-Sacarosa (0.8 M) y se centrifuga nuevamente a 20, 000 G durante 20 min, la fracción sinaptosomal o pastilla (P2) y se resuspende en Krebs-Hepes con la marca radioactiva para los experimentos de AMPc o bien se resuspende en RIPA-SDS en presencia de inhibidores de proteasas, para los experimentos de expresión de proteínas por el método de western blot.

9.6. Estudios de Liberación de [³H]-GABA

9.6.1. Soluciones:

Krebs-Henseleit Normal: NaCl (124.5 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Krebs-Henseleit alto potasio: NaCl (107.5 mM), KCl (15 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Los experimentos de liberación de [³H]-GABA fueron realizados en rebanadas de la sustancia negra reticulada de ratas normales, ratas tratadas con reserpina y ratas con Parkinson experimental.

9.6.2. Obtención de las Rebanadas de la SNr

El día del experimento, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, posteriormente fueron decapitadas y el cerebro fue extraído rápidamente, los cuales fueron fijados en una caja de Petri a la cual se le agregó solución Krebs-Henseleit normal fría (4°C). Posteriormente, la caja de Petri se colocó en un vibrátomo (CAMPDEN Instruments Ltd, USA). Se obtuvieron cortes coronales de los cerebros obtenidos. Posteriormente se realizaron cortes coronales de los cerebros obtenidos de

300 µm de espesor. Posteriormente se obtuvo la sustancia negra reticulada por micro disección de ambos hemisferios cerebrales de ratas normales, ratas tratadas con reserpina y ratas lesionadas unilateralmente. Las rebanadas obtenidas fueron colocadas en un tubo de ensayo con solución Krebs-Henseleit normal. Una vez obtenidas las rebanadas, fueron estabilizadas en solución Krebs-Henseleit a 37°C con burbujeo constante de O₂/CO₂ (95%/5%), por 30 min.

9.6.3. Marca Radioactiva ([³H]-GABA)

Una vez transcurrido el periodo de estabilización, las rebanadas fueron re-suspendidas en solución fisiológica con [³H]-GABA (2 x 10⁻⁸ M, actividad específica 95 Ci/nmol) por 30 minutos en presencia de ácido aminoxiacético para evitar su degradación. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con Krebs normal, para retirar el exceso de marca radioactiva no capturada.

9.6.4. Desarrollo Experimental

A las rebanadas de SNr ya incubadas con [³H]-GABA se les adicionó ácido nipecótico [10 µM] para evitar la recaptura, posteriormente las rebanadas fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se trataron con los fármacos a estudiar para cada condición experimental. Las cámaras fueron perfundidas de forma constante con solución fisiológica a 37°C con burbujeo constante, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Después de un periodo de estabilización y de un lavado de 20 minutos, se colectaron 4 fracciones de 4 minutos

cada una de liberación basal (16 minutos), posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de alto K⁺ para inducir la liberación de [³H]-GABA por despolarización de la terminal, elevando las concentraciones de K⁺ de 3 mM a 15 mM durante 24 minutos, logrando la colecta de 6 fracciones más. Al despolarizar las terminales, se logra la apertura de canales de Calcio dependientes de voltaje, con lo que se logra el influjo de Calcio a la terminal y posteriormente la fusión de las vesículas a la membrana sináptica, liberando el neurotransmisor por exocitosis. Los fármacos fueron perfundidos 2 fracciones antes del pulso despolarizante con alto K⁺ y durante la duración del mismo, en los grupos indicados. En cada experimento se corrieron 20 muestras en paralelo, para cada caso experimental se hicieron cuando menos 4 experimentos, con mínimo de 3 réplicas de cada uno. Al término de cada experimento, las rebanadas fueron extraídas de las cámaras de perfusión y les fue adicionado 1 ml de HCl 1 N, con el fin de desintegrar la membrana y cuantificar la radioactividad remanente en el tejido.

9.6.5. Fármacos Utilizados en Liberación de [³H]-GABA

SKF 38393, agonista selectivo para receptores D₁; SCH 23390, antagonista selectivo para receptores D₁; PD 128,907, agonista selectivo para receptores D₃; GR 103691, antagonista selectivo para receptores D₃; KN-62, inhibidor selectivo de la CaMKII α ; Forskolina, activador de la adenilil cilcasa; NKY 80, bloqueador de la actividad de la adenilil ciclase; H-89, bloqueador de la PKA y Dopamina.

9.6.6. Cuantificación de [³H]-GABA Liberado

Para cuantificar la radioactividad, se adiciono a cada fracción colectada 7 ml de líquido de centelleo. La radioactividad fue determinada mediante un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron obtenidos como liberación fraccional, la cual se obtuvo de la siguiente relación:

$$F.R. = \frac{R.P.F.}{R.P.T.}$$

Donde F.R. es la fracción de liberación, calculada mediante la división de la radioactividad presente por fracción (R.P.F.), sobre la radioactividad remanente presente en el tejido (R.P.T.). La F.R. se expresó en las gráficas como el cociente de la fracción "X" entre la fracción 4 (fracción inmediata anterior al pulso de K⁺), esto con la finalidad de expresar la fracción de liberación por arriba del valor basal en la curva.

9.7. Estudios de Formación de [³H]-AMPC en los sinaptosomas

9.7.1. Incubación con Marca Radioactiva

Una vez obtenidos los sinaptosomas, se marcan con [³H]-Adenina (130 nM) en 3 ml de solución Krebs-HEPES a 37 °C durante 60 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga nuevamente 5 minutos a 4000 rpm y se desecha el sobrenadante

radioactivo. Se resuspende la pastilla sinaptosomal en Krebs-HEPES en presencia de IBMX (1 mM), un inhibidor de las fosfodiesterasas que fue utilizado para evitar la degradación del AMPc.

9.7.2. Activación de los Receptores en Sinaptosomas

La acumulación de AMPc fue estimulada con los fármacos que más adelante serán descritos. Alícuotas de la fracción sinaptosomal fueron distribuidos en tubos teniendo un volumen final de 250 µl, las muestras se mantienen a una temperatura de 37 °C, posteriormente se agregan los fármacos de estudio y se deja un tiempo de estimulación de 10 min. Se detiene la reacción con 100 µl de una mezcla fría de AMPc (4.5 mM), ATP (2.5 mM) y TCA (6%). Se enfría en hielo durante 20 min., se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm. Se recupera el sobrenadante de cada tubo y se deposita en las columnas de intercambio iónico.

9.7.3. Separación del [³H]-ATP y [³H]-AMPc

Se utilizaron columnas de intercambio iónico con resina DOWEX 50W X-4 para la separación del [³H]-ATP y con Alúmina Neutra para la separación del [³H]-AMPc. Las muestras se colocaron primeramente en las columnas DOWEX una vez que se eluyen la mezclas se adiciona individualmente a cada columna 3 ml de H₂O destilada y se colecta [³H]-ATP. Posteriormente se colocan las columnas DOWEX sobre las de Alumina y se adiciona individualmente a cada columna 5 ml de H₂O

destilada, una vez que se eluye la muestra se retiran las columnas DOWEX y se adicionan 4 ml de solución Tris-HCl (50 mM) y se colecta el [³H]-AMPc.

9.7.4. Cuantificación del [³H]-ATP y [³H]-AMPc

A cada muestra se le adiciona 14 ml de líquido de centelleo, se obtienen cuentas de radioactividad de [³H]-ATP y de [³H]-AMPc de cada vial con un contador de centelleo líquido, la formación porcentual de [³H]-AMPc se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ } [^3\text{H}]\text{-AMPc} = \frac{[^3\text{H}]\text{-AMPc}}{[^3\text{H}]\text{-ATP} + [^3\text{H}]\text{-AMPc}} \times 100$$

9.7.5. Fármacos Utilizados en la Formación de [³H]-AMPc

SKF 38393 agonista selectivo para receptores D₁; PD 128,907 agonista selectivo para receptores D₃; SCH 23390 antagonista selectivo para receptores D₁; GR 103691 antagonista selectivo para receptores D₃; Ionomicina moviliza Ca⁺² hacia el interior de la célula; KCl, solución con alto potasio para despolarizar sinaptosomas.

9.8. Determinación de Proteínas por Western-Blot

La determinación de proteínas fue realizada en sinaptosomas. Para algunos casos los sinaptosomas fueron activados con diferentes fármacos por un periodo de 10 minutos. Al término de este tiempo fueron colocados en hielo para finalizar la reacción. Los sinaptosomas fueron tratados con Ripa 1 ml (Tris-HCl 40mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.2%, pH 7.6) junto con inhibidores de proteasas (Complete 20 µl y PMSF [100 mM] 5 µl) y se colocaron en hielo por 15 minutos. Pasado este tiempo los sinaptosomas fueron ultra sonicados y se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Posteriormente se adicionó por cada ml de homogenizado 200µl de buffer de muestra (Tris-Base 0.3125M, SDS 10%, Glicerol 50%, β-Mercaptoetanol 25%, Azul de Bromofenol 0.5%, pH 6.8) y la mezcla fue hervida por 10 minutos y congeladas para su posterior estudio. Se preparó un gel separador al 10 % y se cargó el equivalente a 35-50 µg de proteína. La electroforesis se llevó a cabo a 85 mA en un buffer de corrida (Tris-Base 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 0.1%, pH 8.3). Pasado el tiempo de corrida se colocó el gel en una membrana de PVDF previamente hidratada con metanol. Se montó en una cámara de transferencia semiseca y con buffer de transferencia (Tris Base 0.05M, Glicina 0.38M, Metanol 20%, pH 8.3), se corrió a 400 mA por 40 minutos. Terminado este período la membrana se bloqueó con solución bloqueadora (leche

svelty 7-10% y TBS-Tween al 0.1-0.2%) durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se lavó la membrana con solución TBS-Tween 0.1-0.2% (Tris-base 1 M, NaCl 2 M, Tween 20 0.1-0.5%, agua MilliQ) y posteriormente la membrana es incubó con el anti-cuerpo primario 1:1000 (anti-CaMKII α ; anti-CaMKII α -p-T286; anti-RD₃; anti-RD₁) toda la noche 4° C. Se realizaron 5 lavados de 7 min con TBS- tween y se realizó la incubación con el anti-cuerpo secundario 1:5000 (anti-ratón; anti-conejo) por 2 horas, finalmente se realizaron 5 lavados de 7 min con TBS-Tween. La membrana se tiñó con ECL-plus (general electric) durante 5 minutos (0.5 ml de solución A; 0.5 ml de solución B). Se reveló por el método de Kodak. La membrana se analizó por densitometría con el programa Kodak 1D, donde se obtienen unidades arbitrarias de densitometría por medio de la fórmula:

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

9.8.1. Fármacos Utilizados en la Activación de los Receptores en los Sinaptosomas

SKF 38393 agonista selectivo para receptores D₁; PD 128,907 agonista selectivo para receptores D₃; KCl, solución con alto potasio para despolarizar sinaptosomas; KN-62, bloqueador de la unión Calmodulina a la CaMKII α .

9.9. Determinación de la interacción proteína-proteína por inmuno-precipitación

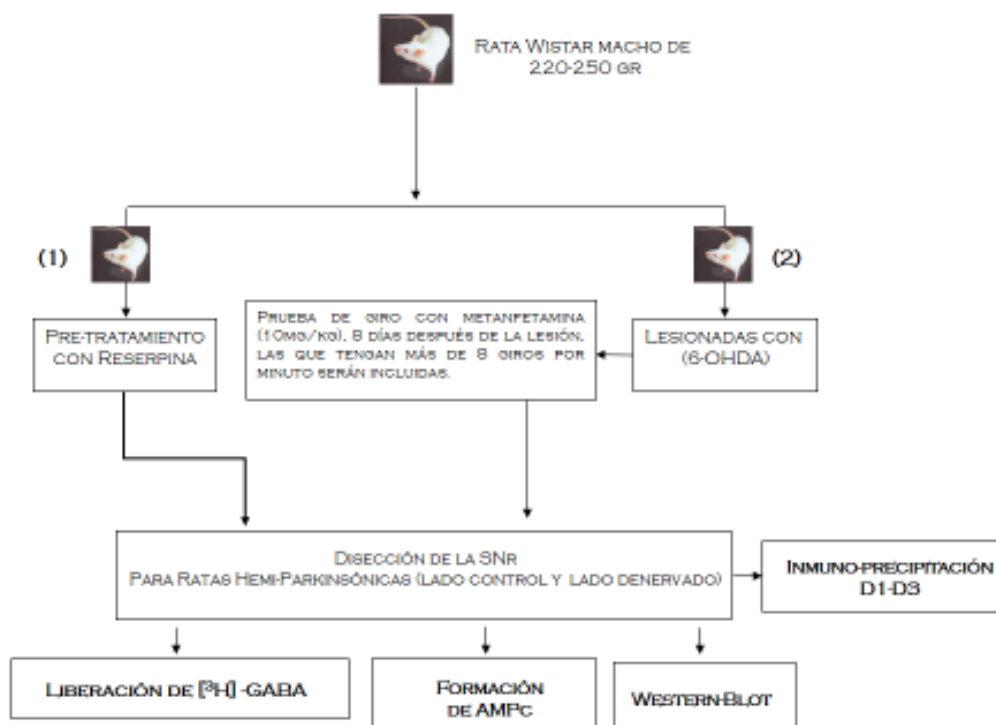
Una vez obtenidos los sinaptosomas, estos fueron puestos a interactuar con el anti-cuerpo que fue requerido para la inmuno-precipitación por un periodo de 5 horas (1-2 μ l de anti-RD₁; anti-RD₃) y se colocó en un agitador orbital a 4°C, posteriormente a la mezcla se le adicionaron 20 μ l de perlas (proteína A/G agarosa) y de nuevo se llevó al agitador orbital toda la noche a 4°C. Una vez llevada a cabo la interacción se lavaron las perlas hasta 5 veces con TBS a 2700 rpm, en una centrifuga para ependorf's refrigerada. Al final se adicionaron 20 μ l de buffer de muestra, la mezcla fue hervida y se prosiguió a realizar la electroforesis y la transferencia como se mencionó anteriormente.

9.10. Análisis Estadístico

Las curvas obtenidas en cada uno de los experimentos de liberación de GABA fueron procesadas para obtener el área bajo la curva (AUC), usando el método de aproximación por trapecios, auxiliados por el software GraphPad Prism 5. Posteriormente las áreas obtenidas en cada condición experimental fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey, utilizando el software antes mencionado. $P < 0.05$ fue tomado como el nivel de significancia estadístico mínimo aceptable entre los grupos. También fueron analizados con el GraphPad Prism 5 las

mediciones de formación de AMPc, realizando ANOVA de una vía y posteriormente una post-prueba de Tukey. $P < 0.05$ fue tomado como el nivel de significancia estadístico mínimo aceptable entre los grupos. Para el Western Blot, una vez obtenido el valor de la densitometría de las bandas correspondientes a cada proteína, fueron evaluadas con el GraphPad Prism 5, se les aplicó un ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey. $P < 0.05$ fue tomado como el nivel de significancia estadístico mínimo aceptable entre los grupos.

9.11. Estrategia Experimental



10. Resultados

Los resultados a continuación serán presentados en 2 secciones: La primera corresponde a experimentos realizados en ratas normales (animales intactos), que fueron tratados con reserpina previo al experimento, con el fin de depletar la dopamina endógena y así evitar la activación de otros receptores para dopamina presentes en las terminales sinápticas, como es el caso de los receptores D₄, y de esta manera solo evaluar el efecto de los receptores de interés con agonistas o antagonistas selectivos. Por último, la segunda parte corresponde a experimentos realizados en ratas con Parkinson experimental (ratas hemiparkinsónicas), donde fue evaluado tanto el lado intacto como el lado denervado.

10.1. Ratas Normales

10.1.1. Co-Expresión de Receptores Dopaminérgicos

D₁ y D₃ en las Terminales Estriado-Nigrales

Una de las principales inquietudes que surgieron en este trabajo fue evaluar la posible heterodimerización de receptores D₁ y D₃ en las terminales estriado-nigrales.

Para evaluar la interacción que estos receptores pudieran tener, nos apoyamos de la

técnica de co-inmunoprecipitación (Fig. 12). Para ello fueron utilizados sinaptosomas de sustancia negra reticulada (terminales sinápticas purificadas). La proteína de sinaptosomas que fue incubada con Ab (anticuerpo) selectivo para RD₃, inmunoprecipitó proteínas que fueron reconocidas por un Ab selectivo para receptores RD₁ en un peso aproximado de 70 KDa (kilo Daltones) (Fig. 12 A, línea 2). Cuando el Ab para inmunoprecipitar fue omitido, la señal fue ausente (línea 1). Al realizar la maniobra contraria, la proteína sinaptosomal que fue incubada con Ab selectivo para RD₁, inmunoprecipitó proteínas que fueron reconocidas por un Ab selectivo para RD₃, encontrando dos bandas en un peso aproximado entre 60 y 70 KDa (Fig. 12 B, línea 2), cuando el Ab para inmunoprecipitar fue omitido, la señal fue ausente (línea 1). Es importante mencionar que estos resultados fueron similares a los ya reportados previamente por Fiorentini et al. (2008) en estriado y Nimchinsky et al. (1997) en cerebro y líneas celulares.

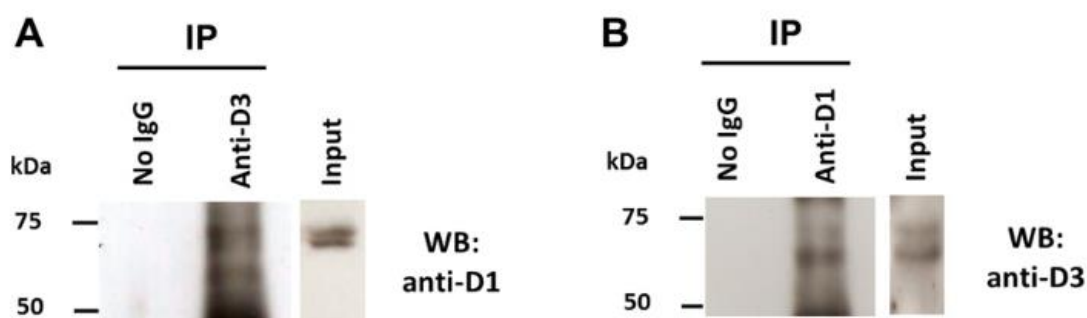


Fig. 12 Co-inmunoprecipitación de receptores D₁ y D₃ en terminales sinápticas de SNr. A, Imagen representativa de una inmunoprecipitación de RD₁ por anticuerpo anti-RD₃ (línea 2). B, Inmunoprecipitación de RD₃ por anticuerpo anti-RD₁ (línea 2). Líneas 1 de ambas figuras fueron realizadas en ausencia de Ab para inmunoprecipitar. 500 µg de proteína fueron utilizados para cada evaluación, que fue replicada 4 veces.

10.1.2. La Activación de los Receptores D₃ Incrementa la Formación de AMPc en Ratas Normales. Efecto Dependiente de la Activación de Receptores D₁

Para evaluar el efecto funcional de la co-activación de receptores dopaminérgicos D₁ y D₃, decidimos primeramente evaluar la formación de AMPc, en ratas pre-tratadas con reserpina, debido a que la liberación de GABA es altamente sensible a la presencia de este segundo mensajero. La formación basal de AMPc siempre fue tomada como el 100% como se muestra en a figura 13. Los receptores D₁ fueron activados con su agonista selectivo SKF 38393 [1 μM], incrementando significativamente la formación de AMPc ($125 \pm 3.7\%$, $p < 0.01$) con respecto del control. La activación de receptores D₃ con su agonista selectivo PD 128,907 [100 nM] no modifica la formación de AMPc ($101 \pm 3\%$) con respecto del control por sí solo. Sin embargo, cuando el PD 128,907 fue adicionado concomitante con el SKF 38393, es decir, fueron co-activados receptores D₁ y D₃, la formación de AMPc se incrementó de manera realmente significativa ($152 \pm 8.1\%$, $p < 0.001$ con respecto al control y $p < 0.01$ con respecto al SKF 38393) (Fig. 13 A).

Para evaluar que los efectos anteriormente descritos son específicos de los receptores que fueron activados, decidimos utilizar antagonistas selectivos para ambos receptores.

El bloqueo de receptores D₁ con su antagonista selectivo el SCH 23390 [100 nM], redujo los efectos mostrados por la activación de receptores D₁ con SKF 38393 cuando fue adicionado solo o concomitante con el PD 128,907 (agonista D₃), a un nivel que no fue significativamente diferente del control ($98 \pm 5\%$) (Fig. 13 B).

En cambio, el bloqueo selectivo de receptores D₃ con GR 103691 [50 nM], redujo la respuesta mostrada anteriormente por la co-activación de receptores D₁ y D₃, al

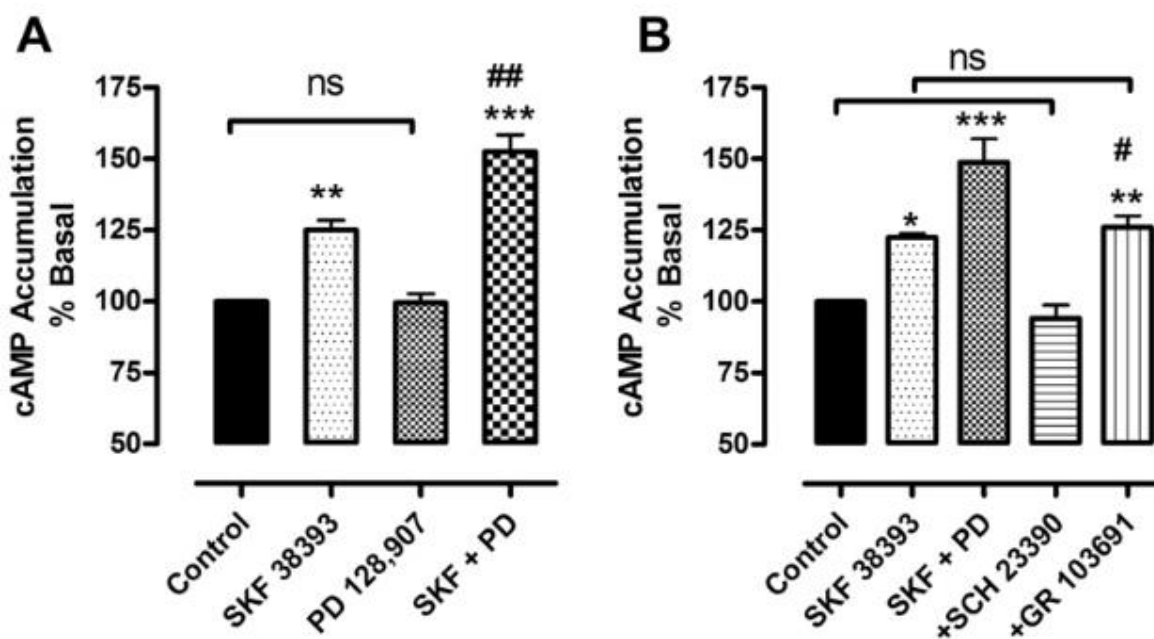


Fig. 13. Efecto de la co-activación de receptores D₁ y D₃ sobre la formación de AMPc. Muestra la formación de AMPc con respecto del control (100%), estimulada por SKF 38393 [1 μ M], PD 128,907 [100 nM], SCH 23390 [100 nM] y GR 103691 [50 nM]. A. La formación de AMPc es más aumentada con la co-activación de receptores D₁ y D₃, que cuando solo se activan únicamente receptores D₁. La activación de receptores D₃ *per se* no modifica la formación de AMPc con respecto al control. (** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control; ## $p < 0.01$ vs SKF 38393). B. El efecto potenciador del receptor D₃ cuando es co-activado con receptores D₁, es inhibido por el GR 103691 (antagonista D₃), cayendo la formación de AMPc a niveles mostrados por el SKF 38393 solo. LA formació de AMPc estimulada por la co-activación de receptores D₁ y D₃, cae dramáticamente a niveles mostrados por control con el antagonismo de los receptores D₁. * $p < 0.05$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control; ** $p < 0.01$ vs control; # $p < 0.05$ vs SKF + PD (ANOVA de una vía, seguido de una post-prueba de Tukey, $n=4$, 4 réplicas por experimento)

nivel que se muestra con la activación de solo receptores D₁ ($126 \pm 4\%$, $p < 0.01$ con respecto al control; $p < 0.05$ con respecto a SKF 38393 + PD 128,907) (Fig. 13 B).

10.1.3. El Incremento de Ca⁺² Citoplásmico Inhibe la Potenciación de los Receptores D₁ por los Receptores D₃

Liu et al (2009), mostró que en el núcleo accumbens los receptores D₃ se encuentran bajo la regulación negativa de la CaMKII α . Este objetivo fue planteado para determinar si los receptores D₃ localizados en las terminales estriado-nigrales, se encuentran bajo la regulación de la CaMKII α . Para esto, evaluamos la respuesta en la formación de AMPc en sinaptosomas estimulada por la co-activación de receptores D₁ y D₃, en presencia de dos diferentes tratamientos: 1) Mediante un influjo masivo de Ca⁺² inducido por Ionominina [50 nM], y 2) Mediante la despolarización con una solución con alto potasio, KCl [15 Mm].

Ambos tratamientos provocan el influjo masivo de Ca⁺² activando a la CaMKII α , provocando la inhibición del efecto potenciador de los receptores D₃ sobre los receptores D₁ (Fig. 14 A y B).

La activación de receptores D1 con SKF 38393 [1 μ M] incrementó la formación de AMPc ($126 \pm 0.3\%$ en fig. 14 A, y $125 \pm 1.2\%$ en fig. 14 B, $p < 0.001$ vs control en ambos grupos). La co-activación de receptores D1 y D3 (SKF 38393 + PD 128907 [100 nM]) incrementó aún más la formación de AMPc, que la sola activación de receptores D1 ($150 \pm 1.1\%$ en fig. 14 A, y $147 \pm 1.85\%$ en fig. 14 B, $p < 0.001$ vs control y vs SKF solo, para ambos casos). Cuando se indujo el influjo masivo de Ca^{+2} (Fig. 14A) y con KCl (Fig. 14 B), ambos tratamientos fueron capaces de disminuir la formación de AMPc que fue estimulada por la co-activación de receptores D1 y D3, a niveles observados donde solo se activaron receptores D1 (Fig. 14 A: SKF 38393 = $126 \pm 0.3\%$ vs SKF 38393 + PD 128,907 + Ionomicina = $125 \pm 2.9\%$. Fig. 14 B: SKF 38393 = $125.7 \pm 1.2\%$ vs SKF 38393 + PD 128,907 + KCl = $125 \pm 1.5\%$). Adicionalmente, en el mismo grupo de experimentos la adición de KN-62 [4 μ M], el cual impide la unión de Calmodulina (CaM) a la CaMKII α (Tokumitsu et al, 1990; Huang and Hsu, 2012), revirtió el efecto bloqueador que generó tanto la ionomicina como la despolarización con KCl (Fig 14 A: SKF 38393 + PD 128,907 + ionomicina + KN-62 = $152 \pm 2.3\%$ vs SKF 38393 + PD 128,907 = $150 \pm 1.15\%$. Fig. 14 B: SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + KN-62 = $147 \pm 0.88\%$ vs SKF 38393 + PD 128,907 = $147 \pm 1.8\%$, ambas diferencias no fueron significativas).

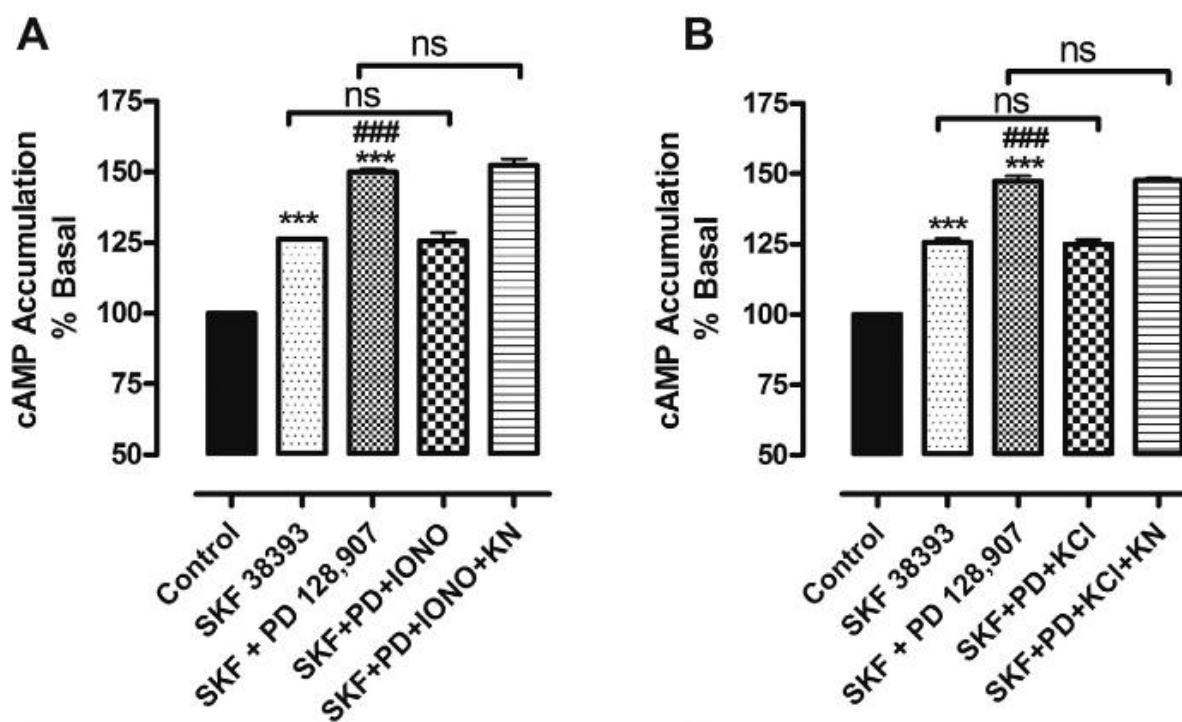


Fig. 14. Efecto del influjo masivo de Ca²⁺ mediante Ionomicina y despolarización con KCl sobre la formación de AMPc estimulada por la co-activación de receptores D₁ y D₃. Muestra la formación de AMPc con respecto del control (100%), estimulada por SKF 38393 [1 μM], PD 128,907 [100 nM], Ionomicina [50 nM], KCl [15 mM] y KN-62 [4 μM]. El efecto potenciador de los receptores D₃ sobre los receptores D₁ en la formación de AMPc es disminuida en ambas graficas (A y B), debido al aumento de Ca²⁺ intracelular generado por ionomicina (Fig. A) y KCl (Fig. B). En ambos tratamientos, la disminución generada en la formación de AMPc, se ve restablecida mediante el uso del inhibidor de la CaMKIIα, el KN-62. Para fig. A y B: ***p < 0.001 vs control; ###p < 0.001 vs SFK 38393; ns, no significativo (ANOVA de una vía, seguido de una post-prueba de Tukey, n=3. 4 réplicas por experimento)

10.1.4. Ca⁺² Extracelular: Fundamental para la Regulación de la Interacción D₃-D₁

Para poder determinar la importancia que el Ca⁺² tiene sobre la regulación de la interacción entre receptores D₁ y D₃, 2 procedimientos que interfieren con el incremento de Ca⁺² intracelular fueron utilizados: 1) Incubación de sinaptosomas en una solución libre de Ca⁺² (evitando el influjo de Ca⁺²), y 2) Incubación con nifedipino [10 µM] un bloqueador selectivo de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Fig. 15 A y B). En estos experimentos, al igual que los presentados previamente, en la co-activación de receptores D₁ y D₃ también se observó el efecto potenciador sobre la formación de AMPc, con respecto a la observada por la sola activación de receptores D₁. Ambas maniobras, tanto la incubación con una solución libre de Ca⁺² como la incubación con nifedipino, previenen la depresión causada por la despolarización con KCl, de la respuesta funcional generada por la co-activación de receptores D₁ y D₃ (Fig. 15 A: SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + Soln. Libre de Ca⁺² = 160 ± 2.7% vs SKF 38393 + PD 128,907 = 157 ± 2.4%. Fig. 15 B: SKF 38393 + PD 128,907 + KCl + Nifedipino = 149 ± 5% vs SKF 38393 + PD 128,907 = 152 ± 2.9%).

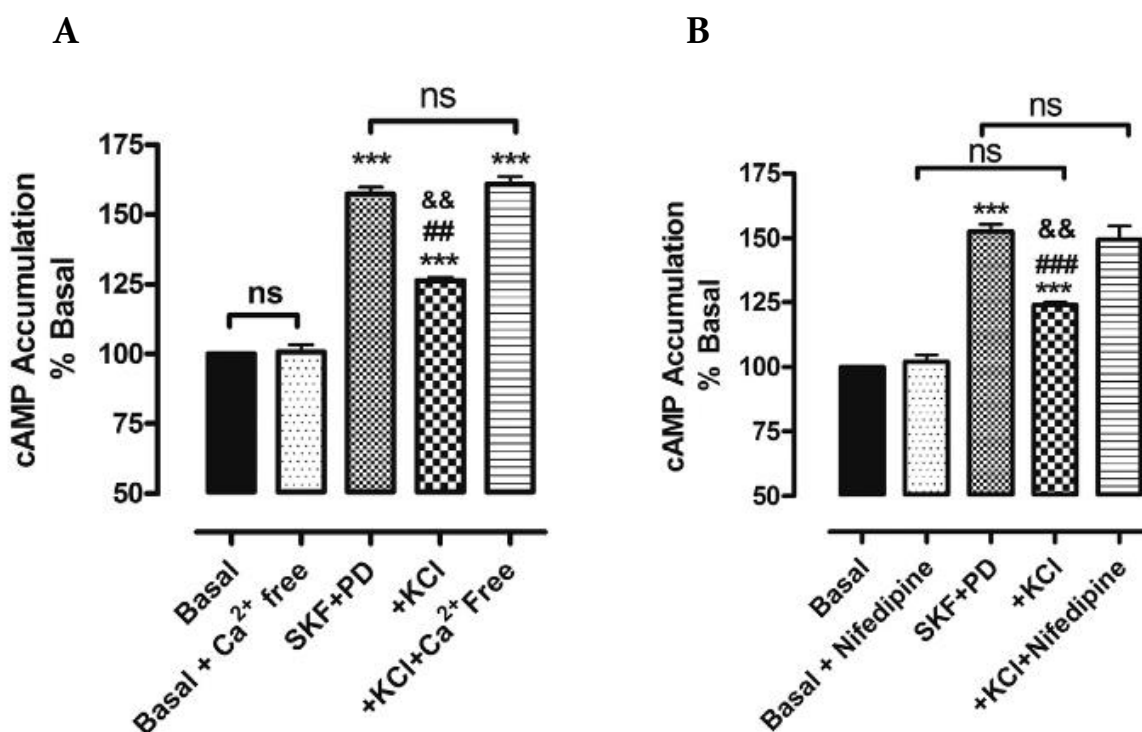


Fig. 15. Efecto de la solución libre de Ca²⁺ y del Nifedipino en el efecto inhibitorio del KCl, sobre el efecto potenciador del RD₃ sobre el RD₁ en la formación de AMPc. Muestra la formación de AMPc con respecto del control (100%), estimulada por SKF 38393 [1 μM], PD 128,907 [100 nM], KCl [15 mM], Nifedipino [10 μM] y una solución libre de Ca²⁺. El efecto potenciador de los receptores D₃ sobre los receptores D₁ en la formación de AMPc es disminuida en ambas graficas (A y B), debido al aumento de Ca²⁺ intracelular generado por el pulso despolarizante con una solución de KCl. En ambos tratamientos, la disminución generada en la formación de AMPc, se ve restablecida mediante la falta de influjo de Ca²⁺ generado por la incubación con una solución libre de Ca²⁺ y con el bloqueo de canales de Ca²⁺ tipo L. Para fig. A y B: ***p < 0.001 vs control; ###p < 0.001 y ##p < 0.01 vs SKF 38393 + PD 128.907; &&p < 0.01 vs +KCl + solución libre de Ca²⁺ o +KCl + Nifedipino; ns, no significativo (ANOVA de una vía, seguido de una post-prueba de Tukey, n=3. 4 réplicas por experimento)

10.1.5. La Despolarización Aumenta la Autofosforilación de la CaMKII α

El incremento de Ca⁺² citoplasmico estimula la activación de la CaMKII α mediante la union del complejo Ca⁺²/calmodulina, dirigiendo a la autofosforilacion de la enzima y posteriormente a la fosforilación de sustratos. Este objetivo fue planteado para determinar el estado de activación de la cinasa por medio de Western Blot (WB), que estando autofosforilada en el residuo Treonina-286 (T-286) que marca su estado de activación puede entonces fosforilar a sus sustratos. Sinaptosomas fueron preparados para detectar por medio de WB al residuo T-286 fosforilado, en distintos tratamientos: fosforilación basal, fosforilación en presencia de KCl [15 mM], fosforilación en presencia de KN-62 [4 μ M] (inhibidor de la CaMKII α) y fosforilación en presencia de KCl + KN-62. La activación de los sinaptosomas para cada caso fue de 10 minutos. La fosforilación basal fue tomada como 100%. La despolarización de sinaptosomas con KCl incrementó considerablemente la autofosforilación de la CaMKII α (Fig. 16. D.O. Relativa 159 \pm 8% vs control). Este incremento en el estado de autofosforilación fue prevenido cuando el KN-62 estuvo presente en la solución de incubación (D.O. Relativa 97 \pm 1.6% vs control). Fig 16, también muestra que el KN-62 no modifica significativamente la fosforilación basal de CaMKII α por si solo (D.O. Relativa 98 \pm 0.8% vs control).

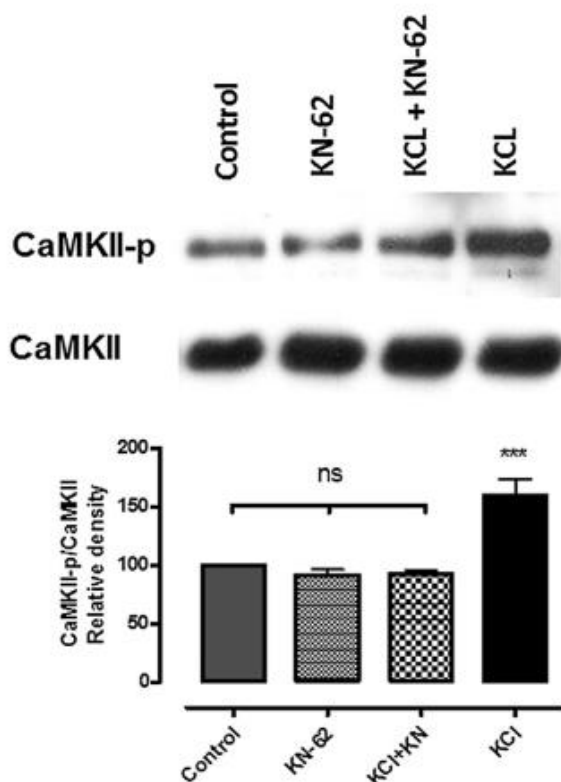


Fig. 16. Efecto de la despolarización con una solución con alto potasio (KCl) sobre el estado de autofosforilación de la CaMKII α . Determinación de la autofosforilación de la CaMKII por diferentes tratamientos, KCl [15 mM], KN-62 [4 μ M]. En la figura superior se muestra la imagen representativa de los inmunoblots utilizando anticuerpos contra la T-286 de la CaMKII α y CaMKII α . En la gráfica inferior se muestra el análisis cuantitativo de la CaMKII-P y CaMKII-Total. *** $p < 0.0001$ vs control; ns, no significativo (ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey, $n=3$)

10.1.6. La Co-activación de los receptores D₁ y D₃ modula la autofosforilación de la CaMKII α

Con el objetivo de determinar si la co-activación de receptores D₁ y D₃ tienen la capacidad de modular el estado de autofosforilación de la cinasa por sí solos, los sinaptosomas fueron activados en presencia de SKF 38393 [1 μ M], PD 128,907 [100 nM] durante 30 minutos (Fig. 17). La autofosforilación basal fue tomada como 100%. La activación de receptores D₁ con SKF 38393 aumentó de manera significativa la autofosforilación de la CaMKII α (D.O. Relativa $125.6 \pm 6.3\%$ vs control). La activación de receptores D₃ con PD 128,907, no tuvo efecto sobre la autofosforilación de la

CaMKII α (D.O. Relativa $99 \pm 1.4\%$). Sin embargo, la co-activación de receptores D₁ y D₃ aumenta aún más la autofosforilación de la CaMKII α ($187 \pm 14.5\%$ vs control).

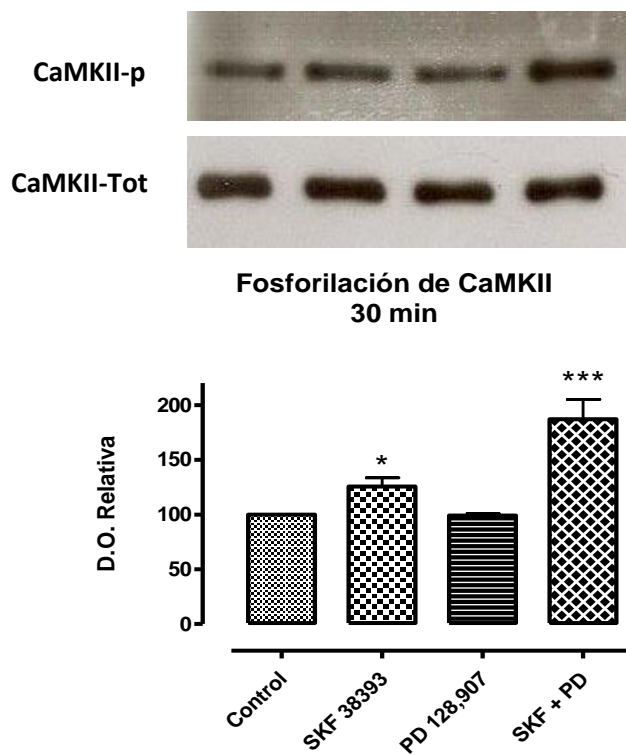


Fig. 17. Efecto de la co-activación de receptores D₁ y D₃ sobre el estado de autofosforilación de la CaMKII α . Determinación de la autofosforilación de la CaMKII por co-activación de receptores D₁ con SKF 38393 [$1 \mu\text{M}$], PD 128,907 [100 nM]. En la figura superior se muestra la imagen representativa de los inmunoblots utilizando anticuerpos contra la T-286 de la CaMKII α y CaMKII α . En la gráfica inferior se muestra el análisis cuantitativo de la CaMKII-P y CaMKII-Total. *** $p < 0.0001$ vs control; * $p < 0.01$ vs control (ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey, $n=3$)

10.1.7. La Potenciación de los Receptores D₁ por los Receptores D₃ en Liberación de GABA es Dependiente del Bloqueo de la CaMKII α

Los resultados previamente mostrados indican que el influjo masivo de Ca⁺² provocado por la despolarización activa a la CaMKII α , teniendo como consecuencia la inhibición del efecto potenciador de receptores D₃ sobre receptores D₁ en la formación de AMPc. Debido a que la liberación de GABA es altamente dependiente de la formación de AMPc, ahora decidimos estudiar los efectos de la co-activación de receptores D₁ y D₃ sobre la liberación de este neurotransmisor inducida por despolarización con una solución con alto potasio (KCl [15 mM]).

Primeramente decidimos evaluar el efecto de la co-activación de receptores D₁ y D₃ sobre la liberación de GABA. En la fig. 18 (A y B) se muestra que, la liberación de GABA estimulada por la activación de receptores D₁ con SKF 38393 en rebanadas despolarizadas con KCl, no fue aumentada aún más cuando se añadió a la solución de perfusión PD 128,907 un agonista de receptores D₃ (Área relativa: SKF 38393 = 6.72 ± 0.54 vs SKF 38393 + PD 128,907 = 6.32 ± 0.18).

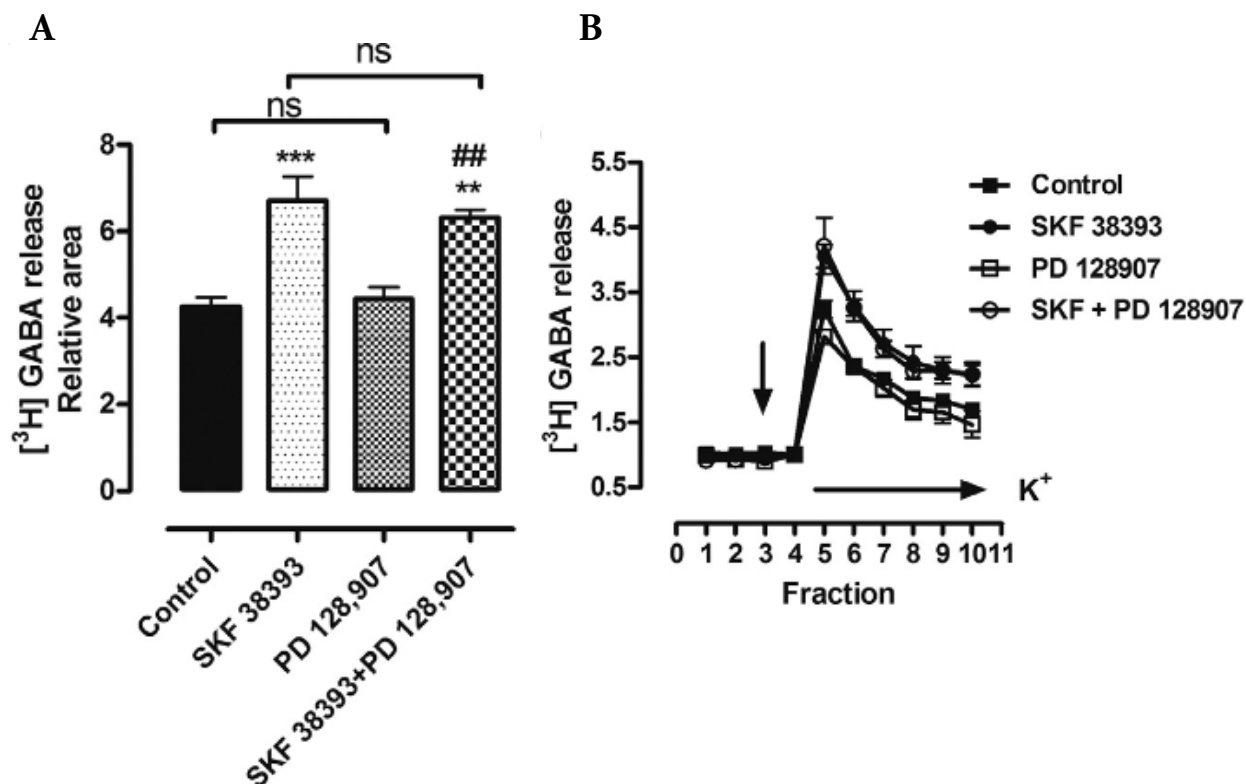


Fig. 18. Efecto de la co-activación de receptores D1 y D3 sobre la liberación de GABA estimulada por un pulso despolarizante. Muestra la liberación de GABA estimulada por SKF 38393 [1 μ M], PD 128,907 [100 nM], pulso despolarizante con KCl [15 mM]. A: Muestra el área bajo la curva de la liberación de GABA estimulada por SKF 38393 y PD 128,907. La co-activación de ambos receptores no aumenta la liberación de GABA con respecto al SKF 38393 solo. B: Muestra la curva de liberación de GABA con los diferentes tratamientos. En el eje de las ordenadas se muestra la liberación de GABA, en el eje de las abscisas se muestran las fracciones colectadas. Los fármacos fueron añadidos en la fracción 3, mientras que el pulso despolarizante entró a partir de la fracción 5. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; ## $p < 0.01$ vs control; ns, no significativo (ANOVA de una vía seguido de un post-prueba de Tukey, $n=4$, 5 réplicas por experimento).

Posteriormente, para evaluar si la carencia del efecto potenciador del PD 128,907 sobre la liberación de GABA estimulada por SKF 38393, fue debido a la activación de la CaMKII α , decidimos evaluar la liberación de GABA en presencia de KN-62 un inhibidor de la CaMKII α (Fig. 19 A y B). Cuando la CaMKII α fue bloqueada con KN-62, fue posible observar el efecto potenciador del PD 128,907 sobre el efecto

del SKF 38393 en la liberación de GABA estimulada por KCl (Área relativa: SKF 38393 + KN-62 = 7.27 ± 0.40 vs SKF38393 + PD 128,907 + KN-62 = 12.19 ± 0.93 , $p < 0.001$). PD 128,907 no tuvo efecto por si solo, ni en presencia de KN-62 (Área relativa: PD 128,907 = 4.43 ± 0.29 vs PD 128,907 + KN-62 = 4.16 ± 0.83 , ns). La liberación estimulada por SKF 38393 por si sola, no se modificó cuando se adicionó el KN-62 (SKF 38393 = 6.72 ± 0.54 vs SKF 38393 + KN-62 = 7.27 ± 0.40) (Fig. 18 A vs 19 A).

Es importante mencionar que para poder observar el efecto potenciador de los receptores D₃ en experimentos de liberación de GABA, estos fueron realizados en presencia de KN-62 (inhibidor de la CaMKII α). En fig. 19 B se muestra que el antagonismo de receptores D₃ con GR 103691 [100 nM] redujo los efectos mostrados por la concomitante administración de SKF 38393 + PD 128,907, a los niveles mostrados por la sola activación con SKF 38393 (Área relativa: SKF 38393 = 7.40 ± 0.47 vs SKF + PD 128,907 + GR 103691 = 6.95 ± 0.35 , ns). El bloqueo selectivo de receptores D₁ con SCH 23390 [100 nM] completamente eliminó la respuesta mostrada por la co-administración de SKF 38393 + PD 128,907, mostrando una respuesta similar a la del control (Área relativa: control = 4.07 ± 0.45 vs SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + SCH23390 = 4.14 ± 0.5 , ns).

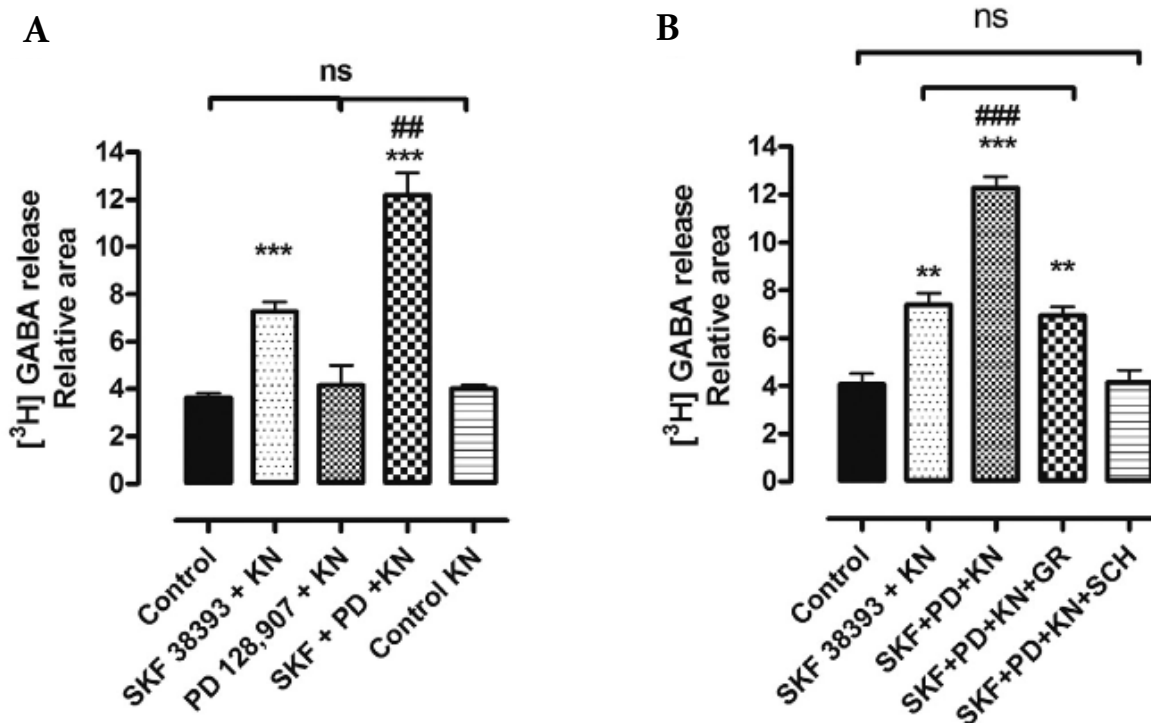


Fig. 19. Efecto de la presencia de KN-62 sobre la liberación de GABA estimulada por la activación de receptores D₁ y D₃. Muestra la liberación de GABA estimulada por SKF 38393 [1 μM], PD 128,907 [100 nM], SCH 23390 [100 nM], GR 103691 [100 nM] pulso despolarizante con KCl [15 mM], KN-62 [4 μM]. A: Muestra el área bajo la curva de la liberación de GABA estimulada por SKF 38393 + PD 128,907 en presencia de KN-62. El uso de KN-62 desenmascara el efecto potenciador del PD 128,907, sobre la liberación de GABA estimulada por SKF 38393. B: Muestra el área bajo la curva de la liberación de GABA. La liberación de GABA es totalmente dependiente de receptores D₁. Los receptores D₃ son encargados del efecto potenciador que genera la activación de receptores D₁. **p<0.01 vs control; ***p<0.001 vs SKF 38393 + Kn-62; ##p<0.01 vs PD 128,907 + KN-62, ###p<0.001 vs control (ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey, n=4-5, 4-5 réplicas por experimento).

10.1.8. La Activación de los Receptores D₃ Aumenta la Respuesta de los Receptores D₁ por sus Ligandos

Para determinar el mecanismo del efecto potenciador sobre la respuesta funcional en la co-activación de ambos receptores, decidimos evaluar la liberación de GABA en una curva dosis-respuesta. Fiorentini et al. (2008), mostró que la co-activación de receptores D₁ y D₃ en sistemas de expresión heteróloga, los receptores D₃ aumentan la afinidad de receptores D₁ por la dopamina. Este objetivo fue planteado para determinar si la activación de receptores D₃ son capaces de aumentar la afinidad de receptores D₁ por su ligando en la sustancia negra reticulada. Fig. 20 A, muestra que la liberación de GABA es dependiente de la concentración de SKF 38393 (agonista D₁), en presencia y ausencia de PD 128,907 (agonista D₃). La dosis efectiva 50 (DE₅₀) para SKF 38393 fue disminuida en presencia de PD 128,907 (DE₅₀ para SKF 38393 = 56.04 nM, IC = 158-19 nM; para SKF 38393 en presencia de PD 128,907 = 4.0 nM, IC = 8.89-1.65 nM). Fig. 20 B, muestra los efectos de la dopamina en presencia y ausencia de KN-62. La dopamina tiene la capacidad de activar a todos sus receptores, por lo tanto, estos experimentos fueron realizados en presencia de L-745,870 para prevenir la activación de receptores D₄ y en presencia de KN-62 para bloquear la activación de la CaMKII α , por el pulso despolarizante. La DE₅₀ fue disminuida de 584 nM (IC = 8156-205 nM) a 56 nM (IC = 105-28 nM), en presencia del bloqueo de la

CaMKII α con KN-62 (Fig. 20 B). La DE₅₀ para el PD 128,907 no fue significativamente cambiada por ambas dosis de SKF 38393 utilizadas [75 nM y 1 μ M], de 98 nM (IC = 385-25 nM) a 71 nM (IC = 412-4 nM).

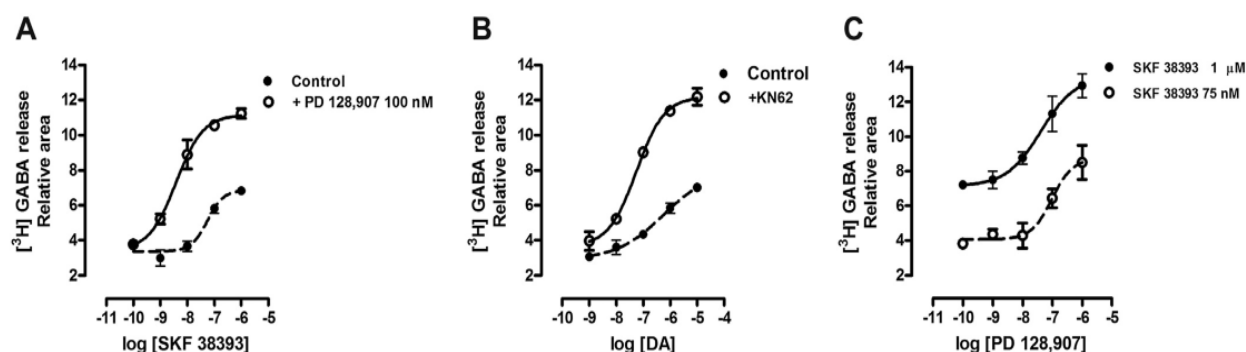


Fig. 20. Curva dosis-respuesta para SKF 38393, Dopamina y PD 128,907, sobre la liberación de GABA, estimulada por despolarización. Liberación de GABA estimulada por SKF 38393 [75 nM y 1 μ M], PD 128,907 [100 nM], KN-62 [4 μ M]. A: Muestra la curva dosis-respuesta sobre la liberación de GABA, con dosis crecientes de SKF 38393, agonista selectivo D₁ en presencia y ausencia de PD 128,907 [100 nM]. B: Muestra la curva dosis-respuesta sobre la liberación de GABA, con dosis crecientes de dopamina en presencia y ausencia de KN-62 [4 μ M]. C: Muestra la curva dosis-respuesta sobre la liberación de GABA, con dosis crecientes de PD 128,907, agonista selectivo D₃ en presencia de SKF 38393 [75 nM y 1 μ M]. n = 5 por curva, 5 réplicas por experimento.

10.1.9. La Liberación de GABA Estimulada por la Co-Activación de Receptores D₁ y D₃ Depende de la Vía de Señalización AC/AMPC/PKA

Este objetivo fue planteado con el fin de determinar la vía de señalización involucrada en la co-activación de receptores D₁ y D₃. Para demostrar si la activación de la vía de señalización AC/AMPC/PKA es suficiente para soportar el efecto

potenciador de los receptores D₃, determinamos el efecto de la co-activación de rebanadas de sustancia negra reticulada con PD 128,907 [100 nM] y forskolina [10 μM] (activador de la adenilil ciclase) sobre la liberación de GABA (Fig. 21 A). La forskolina tuvo un típico efecto esimulatorio sobre la liberación de GABA, sin embargo, la co-administración con PD 128,907 en presencia de KN-62 [4 μM], no tuvo ningún efecto estimulador adicional sobre la liberación de GABA (Área relativa: forskolina + KN-62 = 6.50 ± 0.24 vs forskolina + PD 128,907 + KN-62 = 6.42 ± 0.47). Posteriormente cuando decidimos bloquear la vía de señalización AC/AMPC/PKA, específicamente a la adenilil ciclase con NKY80 [10 μM] y la PKA con H89 [10 μM], los efectos de ambos agonistas SKF 38393 y PD 128,907 (agonista D₁ y D₃, respectivamente) fueron anulados por completo (Fig. 21 B: SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 = 10.12 ± 0.43 vs SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + NKY80 = 3.32 ± 0.49. Fig. 21 C: SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 = 11.36 ± 1.05 vs SKF 38393 + PD 128,907 + KN-62 + H89 = 3.90 ± 0.18). Las rebanadas que fueron tratadas solo con NKY80 o H89 no fueron significativamente diferentes del control (Fig. 21 B y C).

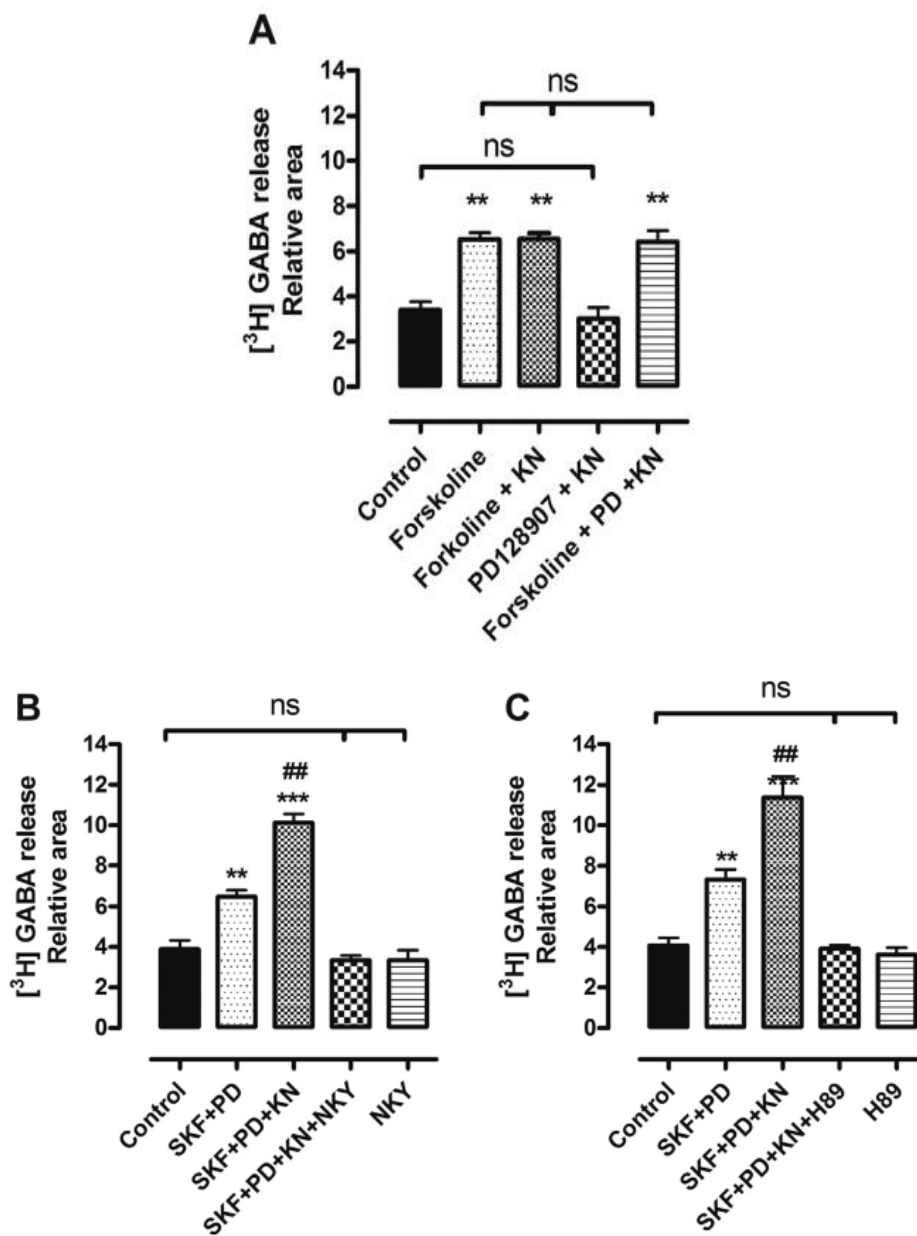


Fig. 21. Papel de la cascada de señalización sobre la liberación estimulada por la co-activación de receptores D1 y D3. Muestra la liberación de GABA estimulada por SKF 38393 [1 μ M], PD 128,907 [100 nM], KN-62 [4 μ M], Forskolina [10 μ M] NKY80 [10 μ M] y H89 [10 μ M]. A: Muestra la liberación de GABA estimulada por la co-activación de la adenilil ciclasa y receptores D3, la co-activación no aumenta la liberación de GABA que es mostrada por la sola activación de la adenilil ciclasa. B: Muestra la liberación de GABA estimulada por la co-activación de receptores D1 y D3 en presencia de NKY80. C: Muestra la liberación de GABA estimulada por la co-activación de receptores D1 y D3 en presencia de H89. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs control; # $p < 0.01$ vs SKF 38393 + PD 128,907; ns, no significativo (ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey, $n=3-4$, 4-5 réplicas por experimento).

10.1.10. KN-62 Estimula la Liberación de GABA Modulada por la Dopamina Endógena

Este objetivo fue planteado para evaluar si la dopamina endógena que llega a la sustancia negra reticulada desde las dendritas de proyección de la sustancia negra compacta, pueden revelar el efecto potenciador por la co-activación D₁ y D₃ previamente descrito. Es importante mencionar que estos experimentos fueron realizados en animales no reserpinizados, debido a que fue evaluado el efecto de la dopamina endógena, que fue liberada por el pulso despolarizante de una solución de KCl [15 mM]. La dopamina liberada por el pulso despolarizante fue capaz de activar a todos los receptores dopaminérgicos presentes en la sustancia negra reticulada (D₁, D₃, D₄), por ello, fue necesario utilizar antagonistas selectivos para los diferentes receptores dopaminérgicos con el fin de evaluar solo los de interés (Fig. 23). En la fig. 22 A, se muestra que la presencia de KN-62 en la solución de perfusión aumenta la liberación de GABA estimulada por la sola despolarización (Área relativa: Control = 3.36 ± 0.20 vs KN-62 = 4.75 ± 0.21 , $p < 0.05$). El antagonismo selectivo de receptores D₄ con L-745,870 [100 nM], por si solo aumentó la liberación de GABA (Control = 3.36 ± 0.20 vs L-745,870 = 5.28 ± 0.18). En presencia de L-745,870 el KN-62 (efecto de receptores D₁ y D₃) aumento aún más la liberación de GABA mostrada previamente (L-745,870 = 5.28 ± 0.18 vs L-745,870 + KN-62 = 7.83 ± 0.75 , $p < 0.001$). En fig 22 B, el

antagonismo selectivo de receptores D₃ con GR 103691 [100 nM], bloqueó la liberación estimulada por KN-62 + L-745,870, indicando que el efecto potenciador ha sido eliminado por el uso del GR 103691, quedando solo el efecto de receptores D₁. En la fig. 22 C, el antagonismo selectivo de receptores D₁ con SCH 23390 [100 nM], redujo la liberación de GABA inducida por la despolarización (efecto de RD₄) (Control = 3.97 ± 0.02 vs SCH 23390 = 2.17 ± 0.09 , $p < 0.05$). SCH23390 también redujo el incremento producido por la adición de KN-62, mostrando la necesidad de la activación de receptores D₁ para los efectos estimulatorios (SCH23390 = 2.17 ± 0.08 vs SCH 23390 + KN-62 = 2.27 ± 0.10 , ns).

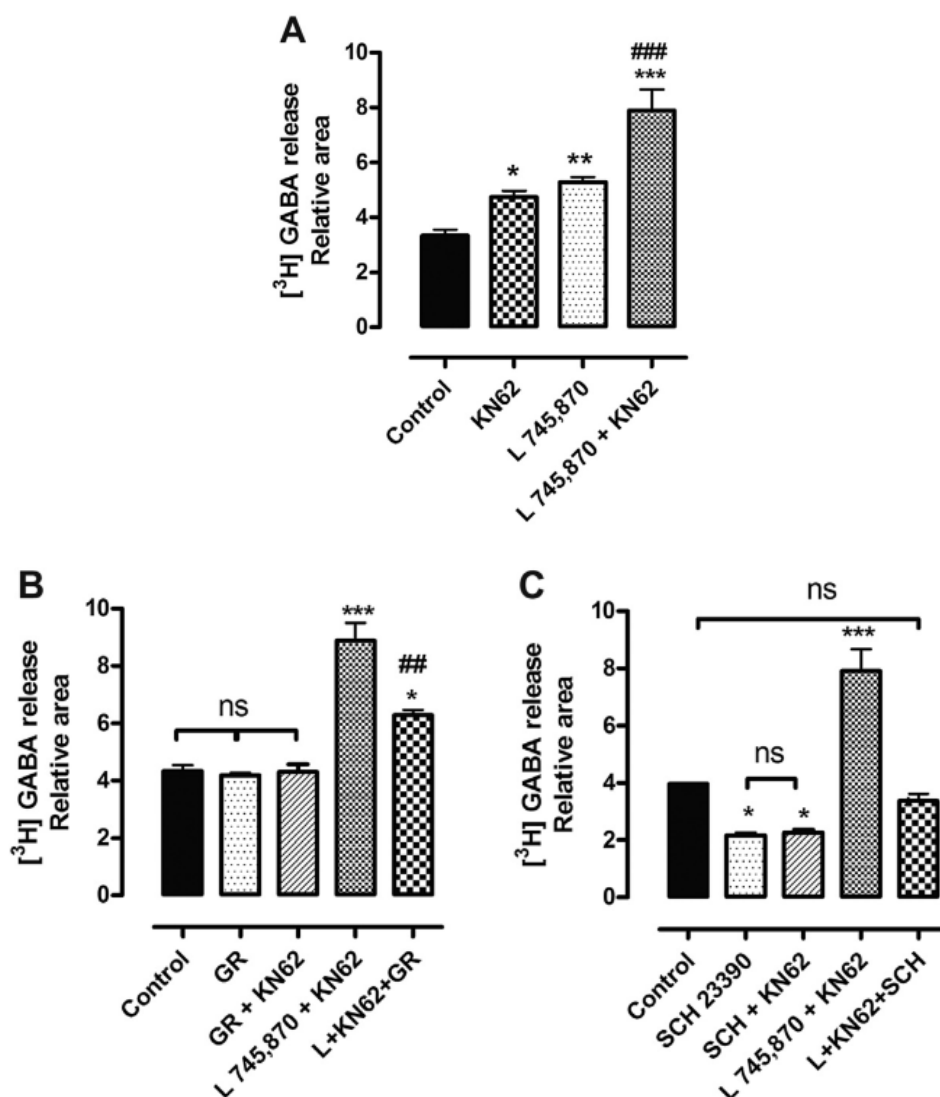


Fig. 22. Efecto de la dopamina endógena sobre la liberación de GABA en animales no reserpinizados y los efectos de los diferentes antagonistas dopaminérgicos. Muestra la liberación de GABA estimulada por KCl [15 mM], KN-62 [4μM], L-745.870 [100 nM], GR 103691 [100 nM], SCH 23390 [100 nM]. A: KN-62 aumenta la liberación de GABA en ambas condiciones control y L-745,870. B: El antagonismo selectivo de receptores D3 con GR 103691 previene el efecto del KN-62 y sobre la condición con L-745,870. C: El antagonismo selectivo de receptores D1 con SCH 23390, previene el efecto potenciador mostrado por el KN-62 sobre la liberación de GABA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control; ##p<0.01 vs L-745,870 + KN-62; ###p<0.001 vs L-745,870; ns, no significativo (ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey; n=3-4, 4-5 réplicas por experimento).

10.2. Ratas Hemiparkinsónicas

10.2.1. La Activación de Receptores D₃ inhibe la Formación de AMPc Estimulada por Receptores D₁

Este objetivo fue desarrollado con el fin de dilucidar el efecto que tiene la activación de receptores D₃ sobre la formación de AMPc (en sinaptosomas) estimulada por receptores D₁ en el lado denervado y el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas. En el lado denervado, la activación de receptores D₁ con SKF 38393 [1 μM] aumentó considerablemente la formación de AMPc (Fig. 23 A: SKF 38393 = 149 ± 9% vs control; p<0.001). La posterior cuando se determinó la respuesta de la co-activación de receptores D₁ y D₃ se encontró que, el PD 128,907 [100 nM] es capaz de disminuir la respuesta ejercida por el SKF 38393 (Fig. 23 A: SKF 38393 + PD 128,907 = 98 ± 10% vs SKF = 38393 149; p<0.001). PD 128,907 por sí solo no tiene ningún efecto sobre la formación de AMPc (PD 128,907 = 103 ± 8.8% vs control; no significativo). En figura 23 B, se muestra el efecto de la co-activación de receptores D₁ y D₃ en el lado intacto de ratas hemiparkinsónicas. La activación de receptores D₁ con SKF 38393 incrementó la formación de AMPc (Fig. 23 B: SKF 38393 = 130 ± 5.7% vs control; **p<0.01). La co-administración de SKF 38393 + PD 128,907 incrementó aún más la respuesta mostrada por la sola estimulación del SKF 38393, evidenciando el efecto

potenciador del PD 128,907 (Fig. 23 B: SKF 38393 + PD 128,907 = $152 \pm 10\%$ vs SKF 38393 = $130 \pm 5\%$; $***p < 0.01$). La sola administración de PD 128,907 no modificó la formación de AMPc (PD 128,907 = $104 \pm 6\%$ vs control; no significativo).

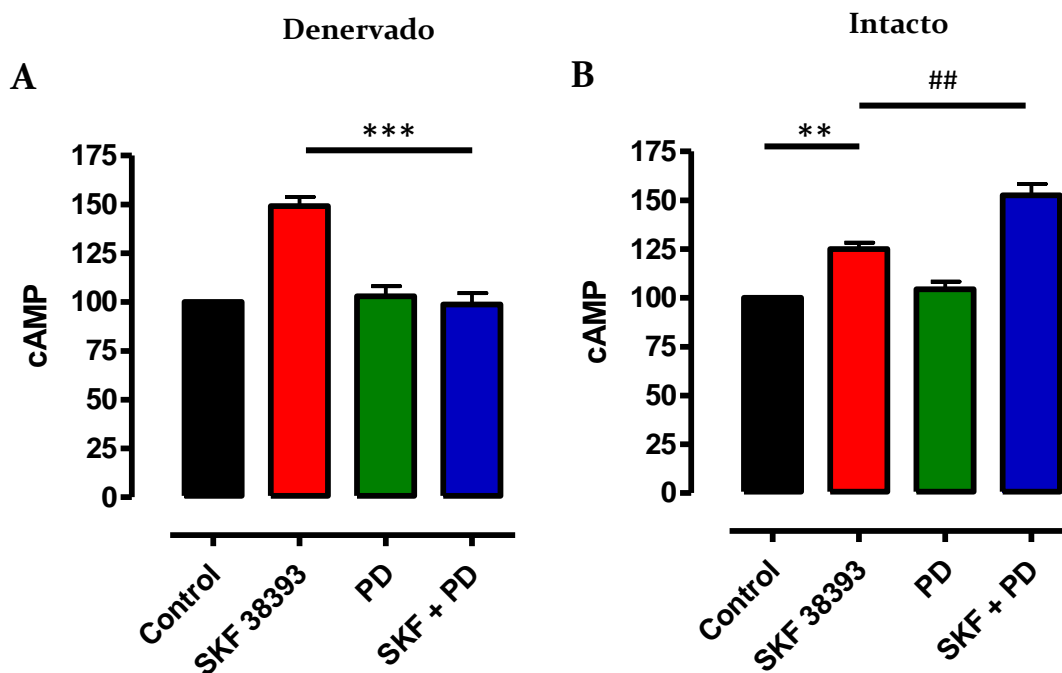


Fig. 23. Efecto de la co-activación de receptores D₁ y D₃ sobre la formación de AMPc en ratas hemiparkinsonianas. Muestra la formación de AMPc en sinaptosomas estimulada por SKF 38393 [$1 \mu\text{M}$] y PD 128,907 [100 nM]. A: En el lado denervado, la activación de receptores D₃ bloquea la formación de AMPc estimulada por receptores D₁. B: En el lado intacto, la activación de receptores D₁ aumenta la formación de AMPc respecto al control, la activación de receptores D₃ potencia el efecto de la activación de receptores D₁. $***p < 0.001$ vs control; $**p < 0.01$ vs control; $##p < 0.01$ vs SKF 38393 (ANOVA de una vía seguido de una post-prueba de Tukey; $n=3-4$; 4-5 réplicas por experimento).

10.2.2. La Activación de Receptores D₃ Inhibe la Liberación de GABA Estimulada por Receptores D₁, de Manera Dosis-Dependiente. Incremento en la Sensibilidad de Receptores D₃

Este objetivo fue realizado con el fin de averiguar si los efectos en la disminución de la liberación de GABA eran dependientes de la concentración de PD 128,907 [0.1 nM – 1 µM]. La liberación de GABA estimulada por SKF 38393 [1 µM] fue prevenida por la adición de PD 128,907 a dosis crecientes de 0.1 nM a 1 µM, encontrando la mayor inhibición a 100 nM (Fig. 24). Interesantemente, el análisis de la curva mostró que el PD 128,907 disminuyó la DE₅₀ con respecto a la encontrada en ratas normales (ver fig. 20), a un valor de 3 nM.

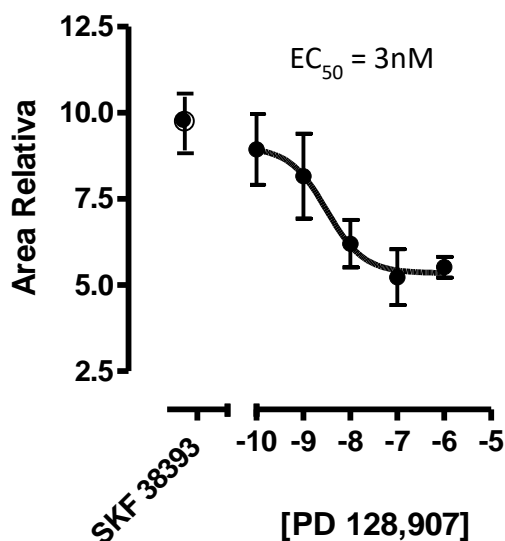


Fig. 24. Curva dosis-respuesta sobre la liberación de GABA en el lado denervado. Muestra la liberación de GABA estimulada por SKF 38393 [1 µM] y PD 128,907 [0.1 nM – 1 µM]. La liberación de GABA estimulada por el SKF 38393 es inhibida por las concentraciones crecientes de PD 128,907, agonista para RD₃. DE₅₀ = 3 nM para PD 128,907.

10.2.3. El Efecto Inhibitorio de los Receptores D₃ en el Parkinson Experimental se Encuentra a Nivel de la Adenilil Ciclasa

Una vez que determinamos que en el Parkinson experimental, la activación de receptores D₃ es capaz de inhibir la respuesta ejercida por la activación de receptores D₁, tanto en la formación de AMPc como en liberación de GABA, nos dimos a la tarea de determinar a qué nivel de la vía de señalización se encuentra dicha inhibición. Para esto realizamos experimentos de liberación de GABA en el lado denervado, en presencia de Forskolina [10 µM] un activador de la adenilil ciclasa, 8-Br-AMPC [350 µM] un activador de la PKA y PD 128,907 [100 nM] agonista selectivo de receptores D₃. Es importante mencionar que solo se presentarán los experimentos realizados en el lado denervado, ya que en el lado intacto no hubo cambios con los diferentes tratamiento efectuados. La activación de la adenilil ciclasa en las rebanadas con Forskolina incrementó considerablemente la liberación de GABA (Fig 25 A: Forskolina = $12 \pm 3.9\%$ vs control = 3.24 ± 0.67 ; $p < 0.01$). La adición de PD 128,907 redujo por completo el efecto mostrado previamente por la sola administración de Forskolina, llegando a niveles mostrados por el control (Forskolina + PD 128,907 = 3.64 ± 0.15 vs Forskolina = 12 ± 3.9 ; $p < 0.01$). La sola presencia de PD 128,907 no modificó la respuesta, mostrándose como el control (PD 128,907 = 3.3 ± 0.9 vs control = 3.24 ± 0.67 ; no

significativo). Al estudiar los efectos de la activación de la PKA, encontramos que la presencia de 8-Br-AMPC incrementó la liberación de GABA (Fig. 25 B: 8-Br-AMPC = 8.3 ± 1.6 vs control = 4.6 ± 0.7 ; $p < 0.01$). La adición de PD 128,907 no modificó la respuesta mostrada por el 8-Br-AMPC (8-Br-AMPC + PD 128,907 = 8.16 ± 0.4 vs 8-Br-AMPC = 8.3 ± 1.6 ; no significativo). La sola presencia de PD 128,907 no modificó la liberación de GABA con respecto al control (PD 128,907 = 4.85 ± 0.38 vs control = 4.6 ± 0.7 ; no significativo).

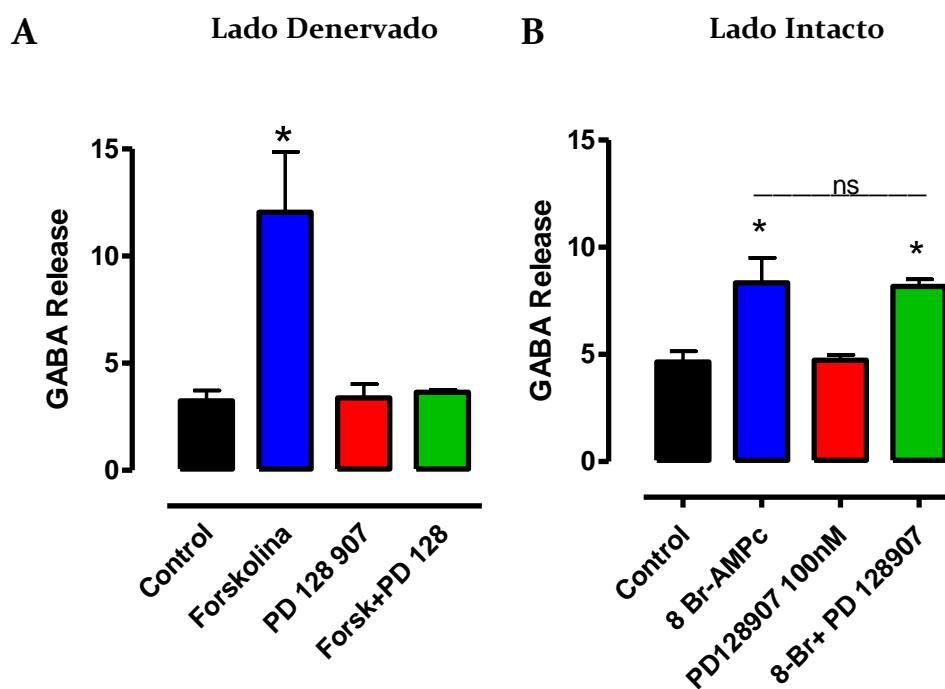


Fig. 25. Vía de señalización en la activación de receptores D₃ en la denervación dopaminérgica (Lado denervado). Muestra la liberación de GABA en rebanadas de la SNr estimulada por un pulso despolarizante con KCl [15 mM] en presencia de Forskolina [10 μ M], 8-Br-AMPC [350 μ M] y PD 128,907 [100 nM]. A: La liberación de GABA estimulada por la Forskolina se ve prevenida por la presencia de PD 128,907. B: La presencia de PD 128,907, no modifica la liberación de GABA estimulada por 8-Br-AMPC. En A: * $p < 0.01$ vs control y vs Forskolina + PD 128,907. En B: * $p < 0.01$ vs control (ANOVA de una vía seguido de u post-prueba de Tukey; $n = 3-4$; 4-5 réplicas por experimento).

11. Discusión

11.1. Co-expresión de Receptores D₁ y D₃ en Terminales Estriado-Nigrales

El hallazgo de que receptores D₁ y D₃ se encuentren presentes en terminales estriado-nigrales (Fig. 12), aunado a que la co-activación de ambos receptores fuertemente estimula la liberación de GABA y la formación de AMPc, nos proporciona una evidencia de que estos receptores se encuentran co-expresados en la misma población neuronal. Estas terminales nerviosas son, en su mayoría, de origen GABAérgico, la mayoría de estas son provenientes del estriado (terminales estriado-nigrales) (Parent and Hazrati, 1995), mientras que la otra parte es proveniente del globo pálido (Smith and Bolam, 1989). Esta inervación GABAérgica se encuentra anatómicamente distribuida, encontrando en terminales estriado-palidales la expresión de receptores D₄ (Acosta-García et al., 2009), mientras que en las terminales estriado-nigrales se encuentran expresados receptores D₁ (de Jesús Aceves et al., 2011). Evidencia adicional muestra la presencia de RNAm para receptores D₁ y D₃ en neuronas espinosas medianas que también expresan el mensajero para sustancia P (Surmeier et al., 1996), es decir, se encuentran en neuronas de proyección estriado-nigral. Interesantemente se ha mostrado la presencia de la proteína para el receptor

D₃ en la sustancia negra reticulada, pero no así el RNAm para este receptor (Díaz, et al, 1995), lo que sugiere un origen externo de los receptores D₃ presentes en la SNr. Nuestros experimentos de inmuno-precipitación realizados en terminales estriado-nigrales, muestran que estos receptores se encuentran interactuando en la misma neurona, como previamente se mostró la interacción de receptores D₁ y D₃ en el estriado (Fiorentini et al., 2008) y en sistemas de expresión heteróloga (Marcellino et al., 2008). Por lo tanto, nuestras observaciones junto con las encontradas en la literatura, indican fuertemente que la co-expresión de receptores D₁ y D₃ en terminales estriado nigrales puede modular la respuesta funcional de estas terminales nerviosas (Cruz-Trujillo, 2013).

11.2. Señalización Atípica de los Receptores D₃

En los experimentos realizados en este trabajo, los efectos de la activación de receptores D₃ fueron atípicos para un receptor que es miembro de la familia del tipo D₂. En general, los receptores pertenecientes a esta familia, interactúan con proteínas G $\alpha_{i/o}$ inhibiendo la formación de AMPc (Missale et al., 1998). Estudios realizados en sistema límbico muestran que, la activación de receptores D₃ actúa como un miembro típico de la familia D₂, inhibiendo la señalización a través de la cascada AMPc/PKA (Schwartz et al., 1998). Sin embargo, este autor también sugiere que la señalización de receptores D₃ puede ocurrir de manera atípica, al tener un efecto sinergista con los

receptores D₁ (Schwartz et al., 1998). En la figura 20, se muestra que el efecto potenciador en la respuesta funcional, depende del aumento en la afinidad de los receptores D₁ por su ligando, provocado por la activación de receptores D₃. Otros estudios han mostrado que, la estimulación de receptores D₃ incrementa la afinidad de los receptores D₁ por su ligando en el estriado (Marcellino et al., 2008). Basados en estos hallazgos previamente descritos y en las observaciones realizadas por otros autores (Fiorentini et al., 2008 y Marcellino et al., 2008), podría proponerse que la formación del heterodímero D₁-D₃, puede ser responsable de esta interacción funcional. Sin embargo, la afirmación de que esta respuesta se debe a la formación de un heterodímero deberá tomarse con cautela, hasta mostrar contundentemente la interacción física entre estas dos proteínas. Por lo tanto, estos resultados son los primeros en mostrar que la co-activación de receptores D₁ y D₃, estimulan la liberación de GABA y la formación de AMPc en las terminales estriado-nigrales (Avalos et al., 2010; Cruz-Trujillo et al., 2013).

11.3. Modulación de la Actividad de Receptores D₃ por la CaMKII α en las Terminales Estriado-Nigrales

El trabajo realizado en este proyecto establece que, la CaMKII α se encuentra regulando la actividad de receptores D₃ en terminales estriado-nigrales. En esta estructura, la activación de receptores D₃ potencia la respuesta mostrada por la

activación de receptores D₁, sobre la liberación de GABA y la formación de AMPc (Avalos et al., 2010; Cruz-Trujillo et al., 2013). En experimentos de formación de AMPc, los procedimientos que incrementaron las concentraciones de Ca⁺² intracelular (ionomicina y despolarización con KCl), bloquearon el efecto potenciador de la activación de receptores D₃. El bloqueo selectivo de la CaMKII α con su inhibidor el KN-62 revirtió el efecto mostrado por el aumento del Ca⁺², indicando que la CaMKII α se encuentra mediando esta respuesta. En acuerdo con esta conclusión encontramos que, los efectos dependientes de la despolarización fueron prevenidos cuando se incubó con una solución libre de Ca⁺² y en presencia de nifedipino (Fig. 15 A y B), implicando una fundamental participación del Ca⁺² en la activación de la CaMKII α . Además, mostramos que la despolarización fue capaz de aumentar el estado de autofosforilación (activación) de la CaMKII α , en una manera sensible al KN-62 (Fig. 16). La activación de receptores D₃ no mostró un efecto potenciador sobre la liberación de GABA que fue estimulada por un pulso despolarizante ni la formación de AMPc, sino hasta que estuvo presente en la solución el KN-62 (Fig. 19 y 14), indicando que la CaMKII α en su forma activa, es capaz de bloquear los efectos de la activación de receptores D₃. Esto comprueba la falta del efecto potenciador sobre la liberación de GABA estimulada por la co-activación de receptores D₁ y D₃, cuando estuvo ausente el KN-62 (Fig. 18). Después de la inhibición de la CaMKII α , los efectos de la activación de receptores D₃ en tejido despolarizado, fueron similares a los reportados en tejido no despolarizado sobre la liberación de GABA espontánea que fue medida por corrientes miniaturas (Cruz-Trujillo et al., 2013). En ambos casos, el efecto

potenciador solo pudo ser observado cuando receptores D₁ y D₃ fueron co-activados. Es importante mencionar que, el efecto potenciador de los receptores D₃ también puede observarse a nivel conductual. Marcellino et al. (2008), mostró que la activación de receptores D₃ incrementa aún más la actividad locomotora de un ratón, cuando es co-activado con receptores D₁, debido muy probablemente a los efectos celulares que en este trabajo son descritos.

Nuestros experimentos demostraron que, la interacción D₃/CaMKII α es más amplia que la originalmente sugerida por Liu et al. (2009), donde se propone que la interacción D₃/CaMKII α fue confinada solamente al núcleo accumbens, ya que no se encontró en alguna otra área del cerebro que ellos examinaron. Interesantemente, la modulación de la CaMKII α en la sustancia negra reticulada es selectiva para receptores D₃. EL KN-62 modificó el efecto del PD 128,907 y de la dopamina actuando sobre los receptores D₃ (Fig. 14, 19 y 20), pero no, sobre las acciones de antagonistas para receptores D₄ (L-745,870) o receptores D₁ (SCH 23390) (Fig. 22). Liu et al. (2009), concluyó que la CaMKII α regula a receptores D₃ situados post-sinápticamente en el NAcc, debido a que estos receptores fueron encontrados en gran número en la densidad post-sináptica purificada. Nuestros experimentos demostraron que la interacción D₃/CaMKII α , se lleva a cabo de manera pre-sináptica: 1) Porque los experimentos de formación de AMPc fueron llevados a cabo en terminales pre-sinápticas purificadas (sinaptosomas), y 2) Porque la CaMKII α es capaz de inhibir la

liberación de GABA que es dependiente de Ca⁺² e inducida por despolarización con KCl.

11.4. Los Receptores D₃, la Liberación de GABA y la Vía de Señalización AC/AMPC/PKA

En la mayoría de las estructuras cerebrales donde se co-expresan los receptores D₁ y D₃, estos tienen efectos antagónicos, ya que los receptores D₁ interactúan con proteínas G $\alpha_{s/olf}$, mientras que los receptores D₃ interactúan con proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Schwartz et al., 1998; Liu et al., 2009). En otras estructuras se ha mostrado que estos dos receptores pueden actuar de manera sinérgica, donde los receptores D₃ aumentan los efectos mostrados por receptores D₁ (SNr, estriado, islas de Calleja y cultivos celulares). Tanto en estas condiciones previamente reportadas (Schwartz et al., 1998; Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008; Cruz-Trujillo et al., 2013) como en nuestros experimentos, el efecto potenciador de los receptores D₃ solo es posible cuando los receptores D₁ son co-activados. Algunos de estos investigadores (Fiorentini et al., 2008 y Marcellino et al., 2008) han estudiado estas interacciones tanto en estriado como en cultivos celulares, concluyendo que la co-activación es necesaria porque la respuesta exacerbada es generada a través de la formación de un heterodímero. La carencia de efecto de los receptores D₃ sobre la liberación de GABA estimulada por Forskolina (Fig. 21) coincide con la idea de que pudiera tratarse de un

heterodímero, ya que la activación de receptores D₃ no le confiere ningún aumento de sensibilidad a la respuesta mediada por el incremento en la actividad de la adenilil ciclasa estimulada por la Forskolina, indicando que la interacción de receptores D₁/D₃ ocurre río arriba de la adenilil ciclasa en la cascada de señalización. Experimentos sobre la formación de AMPc y la liberación de GABA han mostrado que la respuesta funcional es totalmente dependiente de la activación de receptores D₁ (Fig. 13 B y 19 B), mientras que la activación de receptores D₃ potencia los efectos mostrados por la activación de receptores D₁, ya que la presencia de un antagonista selectivo para receptores D₃ (GR 103691) previene el efecto potenciador mostrado por la co-activación de ambos receptores, y el bloqueo selectivo de receptores D₁ previene por completo cualquier respuesta mostrada por la activación de ambos receptores, sugiriendo fuertemente que los receptores D₁ gobiernan esta respuesta funcional. Esta conclusión está en acuerdo con la evidencia de que la vía de señalización AC/AMPc/PKA es el mayor determinante de la liberación de GABA en la sustancia negra reticulada que es mediada por receptores D₁ (Nava-Asbell et al., 2007). Aunado a esto, la supresión de la respuesta en la liberación de GABA, generada por el bloqueo en la vía de señalización AC/AMPc/PKA con inhibidores tanto de la adenilil ciclasa (NKY 80), como de la PKA (H89) fuertemente soportan esta conclusión.

11.5. Incremento de la Afinidad de los Receptores D₁ por los Receptores D₃

En los experimentos realizados sobre la curva de liberación de GABA fue posible determinar la procedencia del efecto potenciador antes mencionado. Previamente se ha discutido que los receptores D₃ están favoreciendo el efecto potenciador, río arriba en la cascada de señalización, al no modificar la liberación de GABA estimulada por la activación de la adenilil ciclasa con Forskolina. En los resultados mostrados en la figura 20 A, cuando se co-activaron receptores D₁ y D₃, la dosis efectiva 50 (DE₅₀) para el SKF 38393 fue disminuida de 56 a 4 nM, indicando que la activación de receptores D₃ incrementa la afinidad de los receptores D₁ por su ligando. En la figura 20 B, la DE₅₀ para la dopamina fue reducida por el KN-62 de 584 a 56 nM. La presencia del KN-62 es fundamental para desenmascarar el efecto de los receptores D₃ activados por la dopamina, en experimentos de liberación donde se lleva a cabo la despolarización. La formación del heterodímero D₂-D₃ ha sido reportada previamente (Scarselli et al., 2001; Pou et al., 2012), teniendo una huella bioquímica similar a la que se muestra en este trabajo, donde, en el heterodímero D₂-D₃ la afinidad de los receptores D₂ se ve aumentada por la co-activación con receptores D₃. En el presente trabajo, los efectos sobre el aumento en la afinidad durante la activación de receptores D₃ *in vivo*, indican que los receptores D₁ se

encuentran más sensibles a concentraciones más bajas de dopamina, que aquellos receptores D₁ que se encuentran solos. Otro estudios en acuerdo con los hallazgos aquí mostrados, indican que la activación de receptores D₃ incrementa la afinidad de receptores D₁, tanto en estriado como en células HEK (Marcellino et al., 2008; Fiorentini et al., 2008). Aunado a esto, también ha sido mostrado en células transfectadas, que la co-activación de receptores D₁ y D₃ modifica el tráfico del receptor D₁, es decir, la activación de receptores D₃ reduce la internalización de receptores D₁ inducida por su agonista (Fiorentini et al., 2008).

11.6. Modulación de la Liberación de GABA Dependiente de la Interacción D₃/CaMKII α

Shakiryanova et al. (2011), puntualizó que el disparo de potenciales de acción puede activar a la CaMKII α . Esta activación puede ser lenta y dependiente de la frecuencia: a baja frecuencia la actividad de la enzima no fue detectada, sin embargo, cuando las neuronas dispararon a altas frecuencias, la actividad de la enzima fue claramente detectada. Estas observaciones junto con nuestros hallazgos muestran que la activación de la CaMKII α es dependiente del influjo de Ca⁺² generado por la despolarización, y que esta activación es capaz de modular la función de receptores D₃ localizados en la SNr. Los resultados de Shakiryanova et al. (2011), sugieren que a una baja tasa de disparo de potenciales de acción, la CaMKII α puede estar inactiva

teniendo un receptor D₃ funcional, mientras que, a una alta tasa de disparo de potenciales de acción la CaMKII α puede activarse teniendo como resultado la inhibición de receptores D₃. Teniendo en cuenta los resultados de Shakiryanova et al. (2011), junto con los obtenidos en este trabajo, puede proveernos las bases de una compleja regulación en la interacción D₃/ CaMKII α . Donde durante una baja actividad neuronal (baja tasa de potenciales de acción) los receptores D₁ y D₃ tienen un efecto sinérgista sobre sus efectos funcionales, es decir, los receptores D₃ sensibilizan a los receptores D₁ aumentando su respuesta. En contraste, una alta actividad neuronal (alta tasa de potenciales de acción) puede interferir con la interacción sinérgista D₁-D₃. En estructuras donde los receptores D₁ y D₃ son antagonistas, los receptores D₃ actuarían como freno para los receptores D₁ a bajas frecuencias, mientras que a altas frecuencias se activaría la CaMKII α removiendo el efecto inhibitorio sobre los receptores D₁.

11.7. Efecto Inhibitorio de los Receptores D₃ en el Parkinson Experimental

La denervación dopaminérgica trae consigo una re-organización en la estructura del funcionamiento de los sistemas involucrados, que comúnmente son llamados cambios plásticos. Muchos cambios plásticos han sido reportados a causa de la denervación dopaminérgica (Napolitano et al., 2002; Pierson et al., 2004; Lessner et

al., 2010). La supersensibilidad de los receptores para dopamina generada por la lesión del sistema dopaminérgico, es una característica en estos modelos de Parkinson experimental (Gerfen et al., 1990; Cai et al., 2002). Nuestros resultados muestran que efectivamente los receptores D₁ se supersensibilizan ante la lesión dopaminérgica, que, aunque disminuyen en número se encuentra incrementado su efecto por cambios en su vía de señalización (Rangel-Barajas et al., 2008), teniendo como resultado una respuesta funcional sobre la formación de AMPc más incrementada que la que presenta la misma condición en el lado intacto de ratas hemiparkinsonicas (Fig. 23 A). Los resultados obtenidos en el lado lesionado de ratas hemiparkinsonicas muestran que la activación de los receptores D₃ *per se*, no es capaz de modular la formación de AMPc, sin embargo cuando los receptores D₃ son co-activados con los receptores D₁, se puede observar claramente el efecto inhibitorio sobre la formación de AMPc que es estimulada por la activación de receptores D₁ (Fig. 23 A). La inhibición en la formación de AMPc puede ser explicada por el acople de receptores D₃ a proteínas G $\alpha_{i/o}$ (McAllister et al., 1995), lo que conlleva a una disminución en la formación de AMPc por inhibición de la adenilil ciclasa (Robinson and Caron, 1997). Interesantemente, esta respuesta funcional solo es observada cuando los receptores D₃ son co-activados con receptores D₁, sugiriendo que su funcionalidad está restringida a la co-activación con receptores D₁. Como se mencionó anteriormente, la denervación dopaminérgica provoca la supersensibilidad de los receptores D₁, aunado a esto se ha mostrado que los receptores de la familia del tipo D₂ también se supersensibilizan aumentando su número (Cai et al., 2002). Resultados mostrados en este trabajo demuestran que la

denervación dopaminérgica supersensibiliza a los receptores D₃ al disminuir la dosis efectiva 50 de su agonista selectivo el PD 128,907 medida sobre la liberación de GABA (DE₅₀ = 3 nM), con respecto a una rata normal que representa el lado intacto de una rata hemiparkinsoniana (ver figuras 20 C y 24), mostrando que su efecto inhibitorio es dependiente de la concentración de PD 128,907, teniendo su efecto máximo inhibitorio a una concentración de 100 nM (Fig. 24). Sin embargo, experimentos adicionales (por ejemplo Binding de radioligando) serán necesarios para demostrar si los receptores D₃ presentes en la SNr podrían estar aumentando en número. Consistente con la idea de que, ante la denervación dopaminérgica el número de receptores D₃ aumenta en la membrana, se ha reportado la existencia de una isoforma del receptor D₃ generada por “splicing alternativo” llamada D₃nf (Fishburn et al., 1993; Richtand, 2006; Pritchard et al., 2006), y que los receptores D₃ puede formar heterodímeros con esta isoforma teniendo como consecuencia la internalización de receptores D₃ evitando su señalización (Richtand, 2006; Richtand et al., 2010; Karpa et al., 2000; Elmhurst et al., 2000). Evidencia adicional mostrada por Prieto et al. (2010), ha reportado que la denervación dopaminérgica disminuye la expresión de esta isoforma (D₃nf). Teniendo en cuenta esta información podría especularse que ante la denervación dopaminérgica, en nuestro sistema hay más receptores D₃ que pueden acoplarse a proteínas G $\alpha_{i/o}$. Datos no publicados por nuestro grupo de trabajo han mostrado que en la denervación dopaminérgica no hay interrupción de la interacción RD₁-RD₃ observada por inmuno-precipitación, lo que concuerda con la especulación que previamente ha sido descrita (el incremento de receptores D₃ que pueden

acoplarse a proteínas $G\alpha_{i/o}$). Evidencia adicional en este trabajo, ha mostrado que efectivamente la respuesta inhibitoria que tiene la activación de receptores D₃ sobre la activación de receptores D₁, se debe al acople de receptores D₃ a proteínas $G\alpha_{i/o}$, ya que los efectos sobre la liberación de GABA estimulada por la activación de la adenilil ciclasa con Forskolina son inhibidos por la activación de receptores D₃, y no así, los efectos de la liberación de GABA por activación de la PKA con 8-Br-AMPC, indicando que el efecto inhibitorio de los receptores D₃ en la denervación dopaminérgica se encuentra a nivel de la adenilil ciclasa (Fig. 25, 28). Previamente se mencionó que, en ratas normales fue necesario el uso de KN-62 (inhibidor de la CaMKII α) para poder revelar el efecto de los receptores D₃. Interesantemente, los experimentos realizados en la denervación dopaminérgica fueron realizados en ausencia de KN-62 (Fig. 24, 25). Reportes recientes han mostrado que en diferentes modelos de Parkinson experimental, se ha encontrado una anormalidad en la función de la CAMKII α (Moriguchi et al., 2012; Picconi et al., 2004), aunado a esto Lessner et al. (2010), ha reportado que en la denervación dopaminérgica se disminuye la expresión de Calmodulina (CaM), proteína que es fundamental para la activación de la CaMKII α (Colbran and Brown, 2004; Hudmon and Schulman, 2002; Griffith et al., 2004). Por lo tanto, en la denervación dopaminérgica el efecto inhibitorio de los receptores D₃ en ausencia de KN-62, bien podrían ser explicados de esta manera.

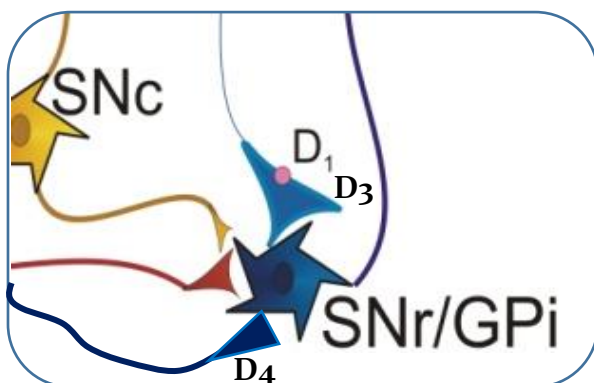


Fig. 26. Localización de los diferentes receptores dopaminérgicos en las aferentes a la SNr que modulan la liberación de GABA. Muestra que los receptores D₁ y D₃ se encuentran en las terminales estriado-nigrales, mientras que, receptores D₄ se encuentran expresados en terminales pálido-nigrales. En azul se muestran proyecciones GABAérgicas, en Rojo proyecciones Glutamatérgicas y en Amarillo proyecciones Dopaminérgicas.

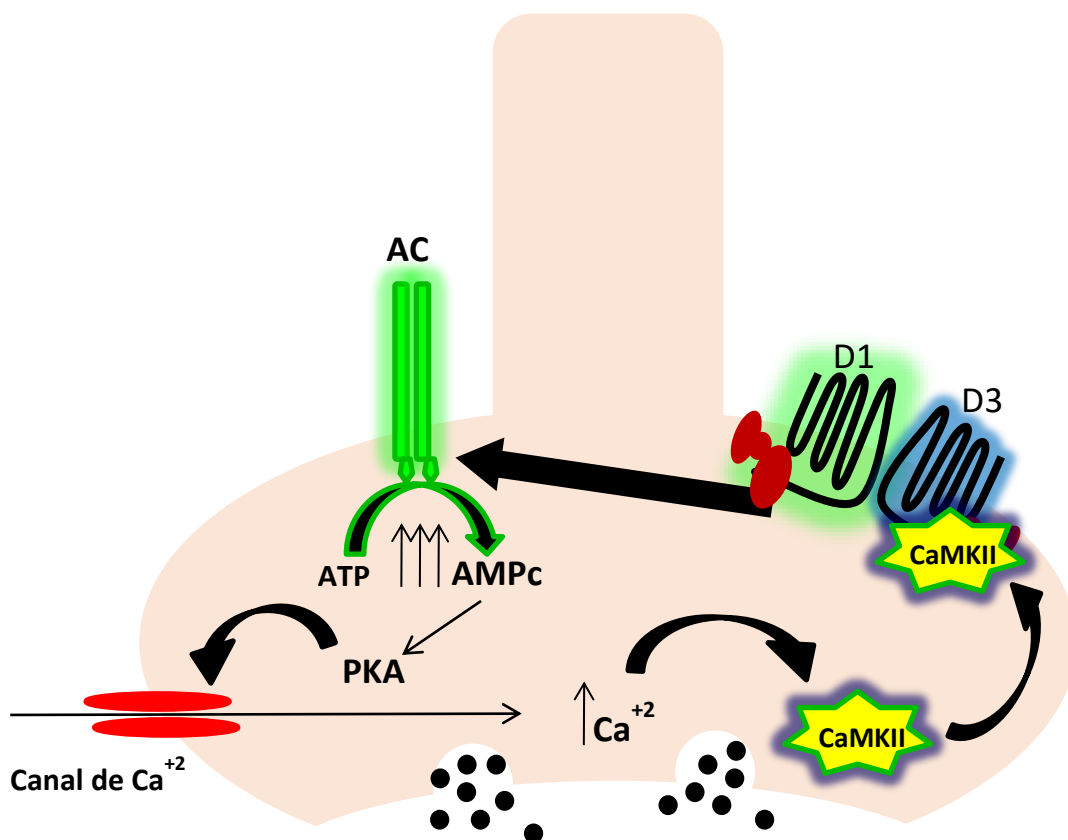


Fig. 27. Representación esquemática de una terminal estriado-nigral. En la imagen se muestra un terminal pre-sináptica, donde el influjo masivo de Ca^{+2} provocado por la co-activación de receptores D₁ y D₃, activa a la CaMKII, esta cinasa en su forma activa migra a la membrana y se le une a los receptores D₃, evitando el efecto potenciador sobre receptores D₁.

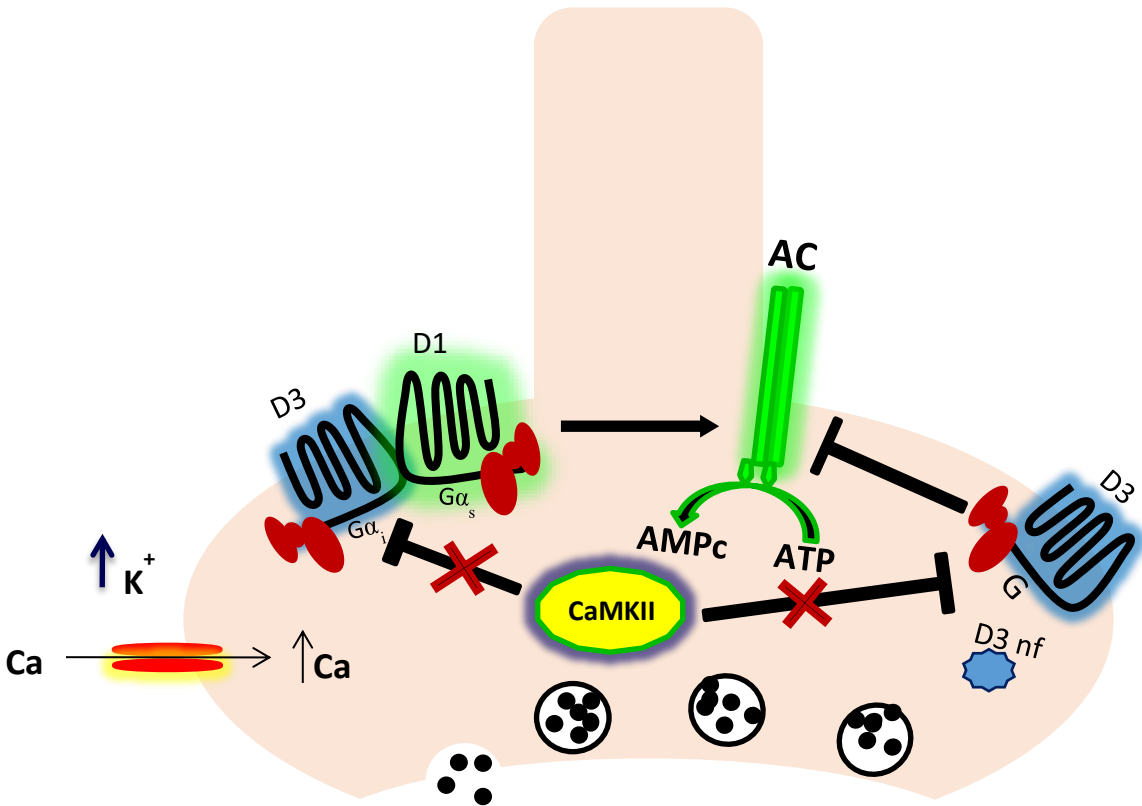


Fig. 28. Representación esquemática de una terminal estriado-nigral en el Parkinson experimental. En la imagen se muestra una terminal pre-sináptica en el Parkinson experimental y los cambios que ocurren con la denervación dopaminérgica. A pesar del influjo masivo de Ca^{2+} por el pulso despolarizante no hay activación de la CaMKII, evidenciando el efecto inhibitorio de la activación de receptores D3 en el Parkinson experimental.

12. Conclusiones

Ratas Normales:

- Los receptores D₁-D₃ se encuentran interactuando de en las terminales estriado-nigrales.
- La activación de los receptores D₃ aumenta la sensibilidad y la respuesta funcional de los receptores D₁.
- La vía de señalización AC-AMPC-PKA es la involucrada en la co-activación de receptores D₁-D₃.
- El influjo masivo de Ca⁺² a la terminal activa a la CaMKII α , lo que inhibe el efecto potenciador de los receptores D₃ sobre los receptores D₁.

Ratas Hemiparkinsonicas:

- La activación de los receptores D₃ bloquea los efectos de los receptores D₁ sobre la liberación de GABA y la formación de AMPC.
- El efecto inhibitorio por los receptores D₃ se ejerce a través de inhibir a la adenilil ciclasa.
- La denervación dopaminérgica supersensibiliza a los receptores D₃.

13. Referencias

- Acosta-Garcia, J., N. Hernandez-Chan, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran. "D4 and D1 Dopamine Receptors Modulate [3h] Gaba Release in the Substantia Nigra Pars Reticulata of the Rat." *Neuropharmacology* 57, no. 7-8 (2009): 725-30.
- 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.
- 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-Montano, 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 Camkii α 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.

- Becker, C., S. S. Jick and C. R. Meier. "Use of Antihypertensives and the Risk of Parkinson Disease." *Neurology* 70, no. 16 Pt 2 (2008): 1438-44.
- 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.
- Bezard, E., S. Ferry, U. Mach, H. Stark, L. Leriche, T. Boraud, C. Gross and P. Sokoloff. "Attenuation of Levodopa-Induced Dyskinesia by Normalizing Dopamine D3 Receptor Function." *Nat Med* 9, no. 6 (2003): 762-7.
- Bezard, E. and C. E. Gross. "Compensatory Mechanisms in Experimental and Human Parkinsonism: Towards a Dynamic Approach." *Prog Neurobiol* 55, no. 2 (1998): 93-116.
- 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.
- Brami-Cherrier, K., E. Valjent, M. Garcia, C. Pages, R. A. Hipskind and J. Caboche. "Dopamine Induces a Pi3-Kinase-Independent Activation of Akt in Striatal Neurons: A New Route to Camp Response Element-Binding Protein Phosphorylation." *J Neurosci* 22, no. 20 (2002): 8911-21.
- Cai, G., H. Y. Wang and E. Friedman. "Increased Dopamine Receptor Signaling and Dopamine Receptor-G Protein Coupling in Denervated Striatum." *J Pharmacol Exp Ther* 302, no. 3 (2002): 1105-12.
- Colbran, R. J. and A. M. Brown. "Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Synaptic Plasticity." *Curr Opin Neurobiol* 14, no. 3 (2004): 318-27.
- Coyle, J. T. and P. Puttfarcken. "Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders." *Science* 262, no. 5134 (1993): 689-95.

- Cruz-Trujillo, R., A. Avalos-Fuentes, C. Rangel-Barajas, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, E. Escartin-Perez, J. Aceves, D. Erij 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.
- Chan, C. S., J. N. Guzman, E. Ilijic, J. N. Mercer, C. Rick, T. Tkatch, G. E. Meredith and D. J. Surmeier. "'Rejuvenation' Protects Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease." *Nature* 447, no. 7148 (2007): 1081-6.
- de Jesus Aceves, J., P. E. Rueda-Orozco, R. Hernandez, V. Plata, O. Ibanez-Sandoval, E. Galarraga and J. Bargas. "Dopaminergic Presynaptic Modulation of Nigral Afferents: Its Role in the Generation of Recurrent Bursting in Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons." *Front Syst Neurosci* 5, (2011): 6.
- Deniau, J. M., A. Menetrey and A. M. Thierry. "Indirect Nucleus Accumbens Input to the Prefrontal Cortex Via the Substantia Nigra Pars Reticulata: A Combined Anatomical and Electrophysiological Study in the Rat." *Neuroscience* 61, no. 3 (1994): 533-45.
- Diaz, J., D. Levesque, C. H. Lammers, N. Griffon, M. P. Martres, J. C. Schwartz and P. Sokoloff. "Phenotypical Characterization of Neurons Expressing the Dopamine D3 Receptor in the Rat Brain." *Neuroscience* 65, no. 3 (1995): 731-45.
- 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): 63-74.
- Exton, J. H. "Regulation of Phosphoinositide Phospholipases by Hormones, Neurotransmitters, and Other Agonists Linked to G Proteins." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, (1996): 481-509.
- Fiorentini, C., C. Busi, E. Gorruso, C. Gotti, P. Spano and C. Missale. "Reciprocal Regulation of Dopamine D1 and D3 Receptor Function and Trafficking by Heterodimerization." *Mol Pharmacol* 74, no. 1 (2008): 59-69.
- Fishburn, C. S., D. Belleli, C. David, S. Carmon and S. Fuchs. "A Novel Short Isoform of the D3 Dopamine Receptor Generated by Alternative Splicing in the Third Cytoplasmic Loop." *J Biol Chem* 268, no. 8 (1993): 5872-8.
- 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.
- Gingrich, J. A. and M. G. Caron. "Recent Advances in the Molecular Biology of Dopamine Receptors." *Annu Rev Neurosci* 16, (1993): 299-321.
- 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.
- Gurevich, E. V. and J. N. Joyce. "Distribution of Dopamine D3 Receptor Expressing Neurons in the Human Forebrain: Comparison with D2 Receptor Expressing Neurons." *Neuropsychopharmacology* 20, no. 1 (1999): 60-80.
- Haber, S. N., J. L. Fudge and N. R. McFarland. "Striatonigrostriatal Pathways in Primates Form an Ascending Spiral from the Shell to the Dorsolateral Striatum." *J Neurosci* 20, no. 6 (2000): 2369-82.

- 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[Beta]1-Ip3-Calcineurin-Signaling Cascade." *J Neurosci* 20, no. 24 (2000): 8987-95.
- Huang, C. C. and K. S. Hsu. "Activation of Nmda Receptors Reduces Metabotropic Glutamate Receptor-Induced Long-Term Depression in the Nucleus Accumbens Via a Camkii-Dependent Mechanism." *Neuropharmacology* 63, no. 8 (2012): 1298-307.
- Hudmon, A. and H. Schulman. "Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: The Role of Structure and Autoregulation in Cellular Function." *Annu Rev Biochem* 71, (2002): 473-510.
- Huntsman, M. M., M. G. Leggio and E. G. Jones. "Nucleus-Specific Expression of Gaba(a) Receptor Subunit Mrnas in Monkey Thalamus." *J Neurosci* 16, no. 11 (1996): 3571-89.
- Hurley, M. J., B. Brandon, S. M. Gentleman and D. T. Dexter. "Parkinson's Disease Is Associated with Altered Expression of Cav1 Channels and Calcium-Binding Proteins." *Brain* 136, no. Pt 7 (2013): 2077-97.
- Joel, D. and I. Weiner. "The Organization of the Basal Ganglia-Thalamocortical Circuits: Open Interconnected Rather Than Closed Segregated." *Neuroscience* 63, no. 2 (1994): 363-79.
- 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.
- Kelly, P. T., T. L. McGuinness and P. Greengard. "Evidence That the Major Postsynaptic Density Protein Is a Component of a Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, no. 3 (1984): 945-9.
- 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.
- Kita, H. and S. T. Kitai. "Efferent Projections of the Subthalamic Nucleus in the Rat: Light and Electron Microscopic Analysis with the Pha-L Method." *J Comp Neurol* 260, no. 3 (1987): 435-52.

- Kultas-Ilinsky, K., V. Leontiev and P. J. Whiting. "Expression of 10 Gaba(a) Receptor Subunit Messenger Rnas in the Motor-Related Thalamic Nuclei and Basal Ganglia of Macaca Mulatta Studied with in Situ Hybridization Histochemistry." *Neuroscience* 85, no. 1 (1998): 179-204.
- Lessner, G., O. Schmitt, S. J. Haas, S. Mikkat, M. Kreutzer, A. Wree and M. O. Glocker. "Differential Proteome of the Striatum from Hemiparkinsonian Rats Displays Vivid Structural Remodeling Processes." *J Proteome Res* 9, no. 9 (2010): 4671-87.
- Lezcano, N., L. Mrzljak, S. Eubanks, R. Levenson, P. Goldman-Rakic and C. Bergson. "Dual Signaling Regulated by Calcyon, a D1 Dopamine Receptor Interacting Protein." *Science* 287, no. 5458 (2000): 1660-4.
- 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.
- 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.

- Moriguchi, S., Y. Yabuki and K. Fukunaga. "Reduced Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activity in the Hippocampus Is Associated with Impaired Cognitive Function in Mptp-Treated Mice." *J Neurochem* 120, no. 4 (2012): 541-51.
- Napolitano, M., D. Centonze, A. Calce, B. Picconi, S. Spiezia, A. Gulino, G. Bernardi and P. Calabresi. "Experimental Parkinsonism Modulates Multiple Genes Involved in the Transduction of Dopaminergic Signals in the Striatum." *Neurobiol Dis* 10, no. 3 (2002): 387-95.
- Nava-Asbell, C., F. Paz-Bermudez, D. Erij, J. Aceves and B. Floran. "Gaba(B) Receptor Activation Inhibits Dopamine D1 Receptor-Mediated Facilitation of [(3)H]Gaba Release in Substantia Nigra Pars Reticulata." *Neuropharmacology* 53, no. 5 (2007): 631-7.
- 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.
- Oak, J. N., J. Oldenhof and H. H. Van Tol. "The Dopamine D(4) Receptor: One Decade of Research." *Eur J Pharmacol* 405, no. 1-3 (2000): 303-27.
- Offermanns, S. "G-Proteins as Transducers in Transmembrane Signalling." *Prog Biophys Mol Biol* 83, no. 2 (2003): 101-30.
- Parent, A. and F. Cicchetti. "The Current Model of Basal Ganglia Organization under Scrutiny." *Mov Disord* 13, no. 2 (1998): 199-202.
- 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.
- Patel, S., S. Freedman, K. L. Chapman, F. Emms, A. E. Fletcher, M. Knowles, R. Marwood, G. McAllister, J. Myers, N. Curtis, J. J. Kulagowski, P. D. Leeson, M. Ridgill, M. Graham, S. Matheson, D. Rathbone, A. P. Watt, L. J. Bristow, N. M. Rupniak, E. Baskin, J. J. Lynch and C. I. Ragan. "Biological Profile of L-745,870, a Selective Antagonist with High Affinity for the Dopamine D4 Receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 283, no. 2 (1997): 636-47.

- Picconi, B., F. Gardoni, D. Centonze, D. Mauceri, M. A. Cenci, G. Bernardi, P. Calabresi and M. Di Luca. "Abnormal Ca²⁺-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function Mediates Synaptic and Motor Deficits in Experimental Parkinsonism." *J Neurosci* 24, no. 23 (2004): 5283-91.
- Pierson, J., J. L. Norris, H. R. Aerni, P. Svenningsson, R. M. Caprioli and P. E. Andren. "Molecular Profiling of Experimental Parkinson's Disease: Direct Analysis of Peptides and Proteins on Brain Tissue Sections by Maldi Mass Spectrometry." *J Proteome Res* 3, no. 2 (2004): 289-95.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe and R. L. Nussbaum. "Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease." *Science* 276, no. 5321 (1997): 2045-7.
- Pou, C., C. Mannoury la Cour, L. A. Stoddart, M. J. Millan and G. Milligan. "Functional Homomers and Heteromers of Dopamine D2I and D3 Receptors Co-Exist at the Cell Surface." *J Biol Chem* 287, no. 12 (2012): 8864-78.
- Prieto, G. A., A. Perez-Burgos, M. Palomero-Rivero, E. Galarraga, R. Drucker-Colin and J. Bargas. "Upregulation of D2-Class Signaling in Dopamine-Denervated Striatum Is in Part Mediated by D3 Receptors Acting on Ca V 2.1 Channels Via Pip2 Depletion." *J Neurophysiol* 105, no. 5 (2011): 2260-74.
- Pritchard, L. M., A. D. Logue, B. C. Taylor, R. Ahlbrand, J. A. Welge, Y. Tang, F. R. Sharp and N. M. Richtand. "Relative Expression of D3 Dopamine Receptor and Alternative Splice Variant D3nf Mrna in High and Low Responders to Novelty." *Brain Res Bull* 70, no. 4-6 (2006): 296-303.
- Quik, M., S. Police, L. He, D. A. Di Monte and J. W. Langston. "Expression of D(3) Receptor Messenger Rna and Binding Sites in Monkey Striatum and Substantia Nigra after Nigrostriatal Degeneration: Effect of Levodopa Treatment." *Neuroscience* 98, no. 2 (2000): 263-73.
- 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.

- Reese, N. B., E. Garcia-Rill and R. D. Skinner. "The Pedunculopontine Nucleus--Auditory Input, Arousal and Pathophysiology." *Prog Neurobiol* 47, no. 2 (1995): 105-33.
- Ribak, C. E., J. E. Vaughn and E. Roberts. "Gabaergic Nerve Terminals Decrease in the Substantia Nigra Following Hemitranssections 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.
- Ridray, S., N. Griffon, V. Mignon, E. Souil, S. Carboni, J. Diaz, J. C. Schwartz and P. Sokoloff. "Coexpression of Dopamine D1 and D3 Receptors in Islands of Calleja and Shell of Nucleus Accumbens of the Rat: Opposite and Synergistic Functional Interactions." *Eur J Neurosci* 10, no. 5 (1998): 1676-86.
- Ritz, B., S. L. Rhodes, L. Qian, E. Schernhammer, J. H. Olsen and S. Friis. "L-Type Calcium Channel Blockers and Parkinson Disease in Denmark." *Ann Neurol* 67, no. 5 (2010): 600-6.
- Robinson, S. W. and M. G. Caron. "Selective Inhibition of Adenylyl Cyclase Type V by the Dopamine D3 Receptor." *Mol Pharmacol* 52, no. 3 (1997): 508-14.
- 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.
- Scarselli, M., F. Novi, E. Schallmach, R. Lin, A. Baragli, A. Colzi, N. Griffon, G. U. Corsini, P. Sokoloff, R. Levenson, Z. Vogel and R. Maggio. "D2/D3 Dopamine Receptor Heterodimers Exhibit Unique Functional Properties." *J Biol Chem* 276, no. 32 (2001): 30308-14.
- Schwartz, J. C., J. Diaz, R. Bordet, N. Griffon, S. Perachon, C. Pilon, S. Ridray and P. Sokoloff. "Functional Implications of Multiple Dopamine Receptor Subtypes: The D1/D3 Receptor Coexistence." *Brain Res Brain Res Rev* 26, no. 2-3 (1998): 236-42.

- Seeman, P. and H. H. Van Tol. "Dopamine Receptor Pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* 15, no. 7 (1994): 264-70.
- Shakiryanova, D., T. Morimoto, C. Zhou, A. K. Chouhan, S. J. Sigrist, A. Nose, G. T. Macleod, D. L. Deitcher and E. S. Levitan. "Differential Control of Presynaptic Camkii Activation and Translocation to Active Zones." *J Neurosci* 31, no. 25 (2011): 9093-100.
- 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.
- Smith, Y. and A. Parent. "Neurons of the Subthalamic Nucleus in Primates Display Glutamate but Not Gaba Immunoreactivity." *Brain Res* 453, no. 1-2 (1988): 353-6.
- 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.
- Sunahara, R. K. and R. Taussig. "Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling." *Mol Interv* 2, no. 3 (2002): 168-84.
- 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.
- Tokumitsu, H., T. Chijiwa, M. Hagiwara, A. Mizutani, M. Terasawa and H. Hidaka. "Kn-62, 1-[N,O-Bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-Methyl-L-Tyrosyl]-4-Phenylpiperazine, a Specific Inhibitor of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II." *J Biol Chem* 265, no. 8 (1990): 4315-20.

- 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.
- Usiello, A., J. H. Baik, F. Rouge-Pont, R. Picetti, A. Dierich, M. LeMeur, P. V. Piazza and E. Borrelli. "Distinct Functions of the Two Isoforms of Dopamine D2 Receptors." *Nature* 408, no. 6809 (2000): 199-203.
- 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.
- 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.
- Yamada, M., A. Inanobe and Y. Kurachi. "G Protein Regulation of Potassium Ion Channels." *Pharmacol Rev* 50, no. 4 (1998): 723-60.
- 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.

ANEXO