



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“PAPEL DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1, D3 Y D4 SOBRE LA
TRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN LA SNR DE LA RATA”**

TESIS QUE PRESENTA

M. en C. REFUGIO CRUZ TRUJILLO

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD

FARMACOLOGÍA

DIRECTOR DE LA TESIS

Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

México, Distrito Federal

SEPTIEMBRE, 2013

AGRADECIMIENTOS AL CONACYT

Este proyecto de investigación fue desarrollado mediante un donativo del CONACYT
(152326)

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES	3
LOS GANGLIOS BASALES, DOPAMINA Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	3
SUSTANCIA NEGRA PARTE RETICULADA.....	6
AFERENCIAS PÁLIDO-NIGRALES Y ESTRIADO NIGRALES	7
PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DE LA SNR.....	9
TRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN LA SNR	11
RECEPTORES GABA _A	12
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1, D3 Y D4 EN LA SNR.....	14
RECEPTOR D1.....	14
RECEPTOR D4.....	17
INTERACCIÓN DE RECEPTORES D1/D3.....	19
ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
METODOLOGÍA.....	25
OBTENCIÓN DE LAS REBANADAS.....	25
SOLUCIONES.....	27
FÁRMACOS.....	29
REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.....	29
CORRIENTES MINIATURA.....	31
ANÁLISIS DE DATOS.....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

RESUMEN EN ESPAÑOL

La actividad de las neuronas de la sustancia negra en su parte reticulada (SNr) está modulada por la liberación de GABA de las proyecciones estriado-nigrales y pálido-nigrales. Esta liberación a su vez está modulada por la dopamina ya que activa receptores dopaminérgicos D1 presentes en las terminales estriado-nigrales y receptores dopaminérgicos D4 en las terminales pálido-nigrales. Además, las neuronas que expresan receptores D1 también expresan receptores D3. En este proyecto doctoral se estudió la posible significancia de la colocalización de los receptores D3 y D1 en las proyecciones estriado-nigrales. Se encontró que al adicionar solamente el agonista de los receptores D1 el SKF 38393 (3 μ M) incrementó la frecuencia de las mIPSCs sin ningún cambio en la amplitud en rebanadas de la SNr, sin embargo, el agonista selectivo de los receptores D3 el PD 128,907 (100 nM) incrementó aún más la frecuencia de las mIPSCs solamente cuando los receptores D1 fueron al mismo tiempo estimulados por su agonista. El antagonista de los receptores D1 el SCH 23390 (100 nM) bloqueó completamente los efectos de la administración simultánea de estos agonistas, mientras que el antagonista de los receptores D3 el GR 103691 (50 nM) bloqueó solamente el efecto potenciador del PD 128,907. Estos hallazgos indican que los receptores D1 y D3 están localizados en la misma proyección. El agonista de los receptores D4 el PD 168,077 (100 nM) disminuyó la frecuencia de las mIPSCs sin alterar la amplitud, este efecto fue bloqueado por el antagonista selectivo de los receptores D4 el L-745,870 (100 nM). Los efectos de la estimulación de los receptores D4 desaparecieron después de lesionar el globo pálido. El agonista de los receptores D3 el PD 128,907 no redujo la frecuencia de las mIPSCs aún en neuronas que respondieron al agonista D4. En resumen, la activación de los receptores D3 en la SNr potencia la estimulación de la liberación del neurotransmisor causada por la activación de las proyecciones estriado-nigrales que tienen receptores D1, mientras que este no tuvo efecto

en las terminales probablemente de origen palidal, que son inhibidas por la activación de los receptores D4.

RESUMEN EN INGLES

The firing rate of substantia nigra reticulata (SNr) neurons is modulated by GABA release from striatonigral and pallidonigral projections. This release is, in turn, modulated by dopamine acting on dopamine D1 receptors at striatonigral terminals and D4 receptors at pallidonigral terminals. In addition, striatal neurons that express D1 receptors also express D3 receptors. In this study we analyzed the possible significance of D3 and D1 receptor colocalization in striatonigral projections. We found that these receptors coprecipitate in SNr synaptosomes suggesting their close association in this structure. D1 agonist SKF 38393 administered alone increased mIPSC frequency in SNr slices, however, the selective D3 agonist PD 128,907 increased mIPSC frequency only when D1 receptors were concurrently stimulated. The D1 antagonist SCH 23390 blocked completely the effects of the concurrent administration of these agonists while the selective D3 antagonist GR 103691 blocked only the potentiating effects of PD 128,907. These findings further indicate that D1 and D3 receptors are localized in the same structure. The D4 agonist PD 168,077 decreased mIPSCs frequency without changing amplitude, an effect that was blocked by the selective D4 antagonist L-745,870. The effects of D4 receptor stimulation disappeared after lesioning the globus pallidus. D3 agonist PD 128,907 did not reduce mIPSCs frequency even in neurons that responded to D4 agonist. In sum, activation of D3 receptors in SNr potentiates the stimulation of transmitter release D1 receptor activation of striatonigral projections while it is without effects in terminals, probably of pallidal origin, that are inhibited by activation of D4 receptors.

INTRODUCCIÓN

La sustancia negra parte reticulada (SNr), uno de los principales núcleos de salida de los ganglios basales está compuesto principalmente de neuronas GABAérgicas que proyectan a los núcleos de relevo del tálamo, el colículo superior y el núcleo pedúnculo pontino (Parent and Hazrati, 1995). El disparo de las neuronas de la SNr está modulado por la liberación de GABA de las aferentes inhibitoras que se originan en el Globo Pálido (GP) y las neuronas espinosas medianas GABAérgicas del estriado. Las fibras pálido-nigrales y estriado-nigrales hacen sinapsis sobre dominios separados del árbol somato-dendrítico: las sinapsis estriado-nigrales se encuentran principalmente sobre las dendritas distales, mientras que las terminales pálido-nigrales forman grandes canastas alrededor del soma y las dendritas proximales. Además, las colaterales intranucleares proporcionan inervación GABAérgica adicional (Parent y Hazrati, 1995; Connelly et al., 2010).

La activación de los receptores dopaminérgicos en la SNr tienen efectos opuestos sobre la liberación de GABA (Acosta-Garcia et al., 2009; Aceves et al., 2011). Estos efectos surgen debido a dos diferentes tipos de receptores a dopamina que se encuentran segregados entre las terminales estriado-nigrales y pálido-nigrales. De los cinco receptores a dopamina acoplados a proteínas G, los receptores D1 que aumentan la liberación de GABA están selectivamente localizados en las proyecciones estriado-nigrales, mientras que los receptores D4 que disminuyen la liberación de GABA están localizados en las terminales pálido-nigrales (Acosta-Garcia et al., 2009; Aceves et al., 2011).

En este proyecto se examinó la distribución y función de los receptores dopaminérgicos en las terminales GABAérgicas de la SNr. En especial nos interesamos en determinar si los receptores dopaminérgicos D3 tienen un papel funcional en la modulación de la liberación de GABA en las terminales de las neuronas estriado-nigrales que coexpresan ARNm tanto para los receptores D3 y D1 (Surmeier et al., 1996). Así que se determinó si los receptores D3 y D1 están coexpresados en las terminales estriado-nigrales interactúan en la modulación de la transmisión GABAérgica. Se analizó la liberación de GABA al medir mIPSCs para evitar posibles efectos secundarios producidos cuando los potenciales de acción son provocados por la estimulación eléctrica de las rebanadas (Radnikow y Misgeld, 1998). Además se examinó si los receptores D3 están activos en

terminales moduladas por el receptor D4 que probablemente corresponden a proyecciones pálido-nigrales.

GENERALIDADES

1. LOS GANGLIOS BASALES, DOPAMINA Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los Ganglios Basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales relacionados anatómicamente y funcionalmente en circuitos específicos o segregados, y que también incluyen regiones discretas del tálamo y la corteza (Alexander et al., 1986, 1990; Middleton y Strick, 2000). Estos circuitos se nombran dependiendo de la función de las áreas corticales de las que proceden como circuito “motor”, “asociativo”, “límbico”, y “oculomotor”, cuya organización anatómica general es similar, pero las regiones de los componentes corticales y subcorticales son diferentes (Alexander et al., 1986). En términos de la participación de los ganglios basales en la fisiopatología de los trastornos de movimiento, el circuito motor es de particular importancia, y será el que se describa en detalle a continuación.

El circuito “motor” se origina en las áreas de la corteza motora frontal y consiste en porciones motoras del cuerpo estriado (caudado y putamen), segmento externo del Globo Pálido (GPe), Núcleo Subtalámico (NST), segmento interno del Globo Pálido (GPi, llamado núcleo entopeduncular en roedores), Sustancia Negra parte reticulada (SNr) y el Tálamo, volviendo a la Corteza Frontal. La anatomía de las conexiones individuales dentro de este circuito se ha descrito con considerable detalle. Dentro de los ganglios basales, el cuerpo estriado y el NST sirven como núcleos de entrada, mientras que el GPi y la SNr sirven como núcleos de salida. Los núcleos de entrada y salida de los ganglios basales están conectados a través de dos vías principales que se oponen entre sí: la vía GABAérgica “directa” es una proyección monosináptica que surge de las neuronas espinosas medianas del estriado que expresan receptores D1, sustancia P y Dinorfina, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la actividad de las neuronas del GPi/SNr, por lo que facilita el movimiento; y la vía “indirecta” surge de las neuronas espinosas medianas que expresan receptores D2 y Encefalina que proyectan al GPi/SNr a través de una vía polisináptica que involucra relevos en el GPe y el NST, ejerciendo un efecto de excitación por lo que inhibe o detiene el movimiento (Wichmann 2011).

Las neuronas del GPi/SNr disparan en una manera tónica, manteniendo a las estructuras blanco en el tálamo y el tallo cerebral bajo un control inhibitor tónico. Las proyecciones del GPi/SNr se dirigen sobre todo hacia los núcleos ventrolateral y ventral anterior del tálamo (VL y VA, respectivamente). El VL y VA envían proyecciones relativamente menores a los ganglios basales, pero envían proyecciones de forma masiva a las áreas corticales frontales de la cual surge el circuito motor, así al menos parcialmente cierran el circuito motor córtico-subcórtico-cortical. Las colaterales de las proyecciones del GPi/SNr hacia el VL/VA alcanzan al núcleo centromediano "motor" (CM) y al "no motor" núcleo parafascicular (Pf), así como a blancos del tallo cerebral tales como el núcleo pedúnculo pontino, y la formación reticular (Smith et al., 2009). Estos núcleos proyectan de nuevo a las regiones motoras y no motoras del estriado y pueden funcionar como un sistema de retroalimentación por el cual el procesamiento del estriado está influido por la salida de los ganglios basales (Smith et al., 2004). Una de las funciones importantes adicionales de los núcleos intralaminares talámicos es proporcionar información sobresaliente al estriado durante el aprendizaje de procedimientos (Kimura et al., 2004; Minamimoto et al., 2009).

Se ha sabido durante muchas décadas que el neurotransmisor dopamina está presente en altas concentraciones en los ganglios basales. El suministro de dopamina en estas estructuras se origina en los núcleos del cerebro medio dopaminérgico, la SNc y el área ventral tegmental. El cuerpo estriado es el sitio de liberación de dopamina más importante en los ganglios basales, que influye en el balance global de la actividad a lo largo de las vías directa e indirecta a través de diferentes tipos de receptores de dopamina (Gerfen et al., 1990). Los receptores D1-like (D1LR, incluyen los receptores D1 y D5) se encuentran en las neuronas del cuerpo estriado que dan lugar a la vía directa, mientras que los receptores D2-like (D2LRs, incluyen los receptores D2, D3 y D4) se encuentran en las neuronas del cuerpo estriado que dan origen a la vía indirecta. De acuerdo a los modelos tradicionales de los ganglios basales, el incremento mediado por la dopamina en la actividad de la vía directa inhibitoria, en conjunción con la reducción mediado por dopamina de la actividad en la vía excitadora indirecta conduce a una reducción general de

la actividad de las neuronas GPi/SNr, con capacidad para desinhibir las neuronas de proyección tálamo-corticales, por lo que facilita el movimiento (Obeso, 2011).

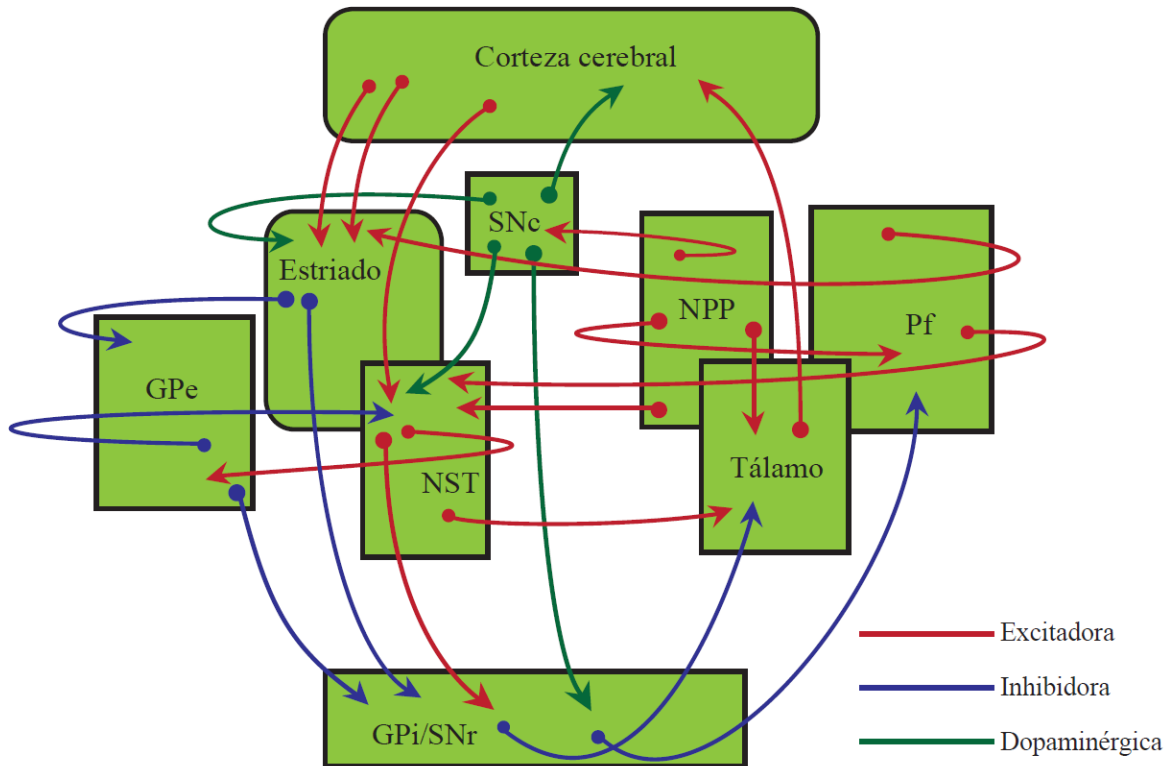


Figura 1: Esquema del modelo actual de los circuitos de los ganglios basales que muestra la organización anatómica y funcional entre los ganglios basales, el tálamo y la corteza cerebral. Abreviaciones: SNc, Sustancia Negra parte compacta; GPe, porción externa del Globo Pálido; GPi, porción interna del Globo Pálido; SNr, Sustancia Negra parte reticulada; NPP, Núcleo Pedúnculo pontino; Pf, Parafascicular; NST, Núcleo Subtálámico (Esquema basado en Obeso 2011).

Además de las proyecciones nigro-estriado, en los últimos años la acumulación de evidencias muestran que la dopamina también ejerce un importante efecto sobre otros núcleos de los ganglios basales (Smith y Villalba, 2008). Estas proyecciones —llamada la vía nigro-extraestriatal— probablemente tienen un papel clave en la fisiopatología de los ganglios basales, particularmente en los mecanismos de compensación que subyacen a las primeras etapas de la enfermedad de Parkinson. Los núcleos de los ganglios basales tales como el GPe, GPi, NST y la SNr son inervados por terminales dopaminérgicas nigrales. Tanto los receptores D1 y D2 (y en menor medida los receptores D3, D4 y D5) se encuentran en la mayoría de estos núcleos. El papel que juega la dopamina (excitación ó

inhibición) depende en última instancia del tipo de receptor que sea activado así como en la localización pre ó post-sináptica de un receptor dado. Recientemente, se ha prestado atención a los efectos de dopamina en los núcleos extra-estriatales y las implicaciones en los mecanismos de compensación en la enfermedad de Parkinson (Rommelfanger y Wichmann, 2010).

El vaciamiento del contenido de dopamina, la característica clave del estado parkinsoniano, reduce la facilitación de las MSNs que pertenecen a las proyecciones "directa" y aumenta la activación de las neuronas de la vía "indirecta", dando lugar a una mayor actividad del NST que a su vez sobreactiva a las neuronas inhibitorias del GPi/SNr. De esta manera, la combinada reducción de la inhibición GABAérgica de la vía "directa" de las neuronas estriatales y el incremento de la conducción glutamatérgica de la desinhibición del NST produce una mayor activación en el GPi/SNr, reduciendo efectivamente la probabilidad de la actividad inhibitoria fásica en estas neuronas de salida, así de este modo se impide el inicio y la ejecución del movimiento. Estudios realizados en el mono por Crossman y colaboradores (1990) condujo a un entendimiento similar del estado discinético (es decir, hemicorea-balismo y discinesias inducidas por levodopa), en esencia consideró el resultado de la disminución de la estructura de salida el GPi y por lo tanto representa un espejo funcional del estado parkinsoniano (Crossman, 1990).

2. SUSTANCIA NEGRA PARTE RETICULADA Y SUS AFERENCIAS GABAÉRGICAS

Mientras que el estriado es la principal estructura de entrada de los ganglios basales que integra información somato-sensorial mediada por glutamato procedente de varias estructuras corticales y talámicas, la Sustancia Negra en su parte reticulada junto con el Globo Pálido interno parecen funcionar como un área importante de salida en la etapa final del procesamiento de la información dentro de los ganglios basales (Parent y Hazrati, 1995). Esta estructura que está compuesta de neuronas GABAérgicas de proyección, contiene varios tipos de neuronas que pueden ser diferenciadas con respecto al tamaño y la forma del cuerpo celular, el grosor y la extensión general de su campo dendrítico. De acuerdo a la forma del soma son: fusiformes, poligonales, triangulares, ovoides y redondas

(Shen y Johnson, 1997). El tamaño del soma varía de 22-29 micras de diámetro dependiendo de la localización del cuerpo celular (Cebrián et al., 2007).

2.1 AFERENCIAS ESTRIADO-NIGRALES Y PÁLIDO-NIGRALES: Estudios anatómicos utilizando técnicas de trazado axonal han establecido que las neuronas GABAérgicas de proyección de la SNr reciben entradas GABAérgicas de las neuronas del GPe (Smith y Bolam, 1989, 1991; Bevan et al., 1994, 1996). Las terminales de las aferentes del GPe hacen grandes sinapsis simétricas preferencialmente sobre el soma y las dendritas proximales sobre las neuronas GABAérgicas de la SNr, mientras que las aferentes del estriado hacen pequeñas sinapsis pero aparentemente más numerosas sobre las dendritas distales. Estos datos anatómicos sugieren que la entrada del GPe podría poderosamente influir sobre la actividad neuronal de la SNr (Smith y Bolam, 1989, 1991).

Connelly y colaboradores 2010 utilizaron una preparación de rebanadas cerebrales sagitales que les permite estimular el estriado y el GPe por separado. Este demostró convincentemente que la activación incluso de una sola neurona del GPe evoca grandes IPSCs en las neuronas GABAérgicas de la SNr, confirmando la predicción original basado en las datos anatómicos. Igualmente de importante encontró que las sinapsis estriado-nigrales se facilita durante la activación repetitiva, mientras la sinapsis pálido-nigral se deprime. Así, cuando las usualmente silentes neuronas espinosas medianas que expresan receptores D1 se activan y producen repetitivas salidas que reciben fuertes entradas glutamatérgicas convergentes de las áreas corticales y talámicas (Zheng y Wilson 2002; Smith et al., 2004), pueden inducir robustos IPSPs e inhibir efectivamente a las neuronas GABAérgicas de la SNr (Connelly et al., 2010). Por el contrario, debido a la naturaleza de depresión de la sinapsis pálido-nigral y el disparo espontaneo de alta frecuencia de las neuronas del GABAérgicas de la SNr después de una breve pausa que permite a la sinapsis recuperarse de la depresión tónica (Connelly et al., 2010). Debido a la poderosa proyección GPe-SNr, la activación de las neuronas espinosas medianas que expresan receptores D2 pueden aumentar la actividad de las neuronas GABAérgicas de la SNr al inhibir las neuronas del GPe (Chuhma et al., 2011; Kravitz et al., 2010). La inhibición de las neuronas

palidales incrementa el disparo neuronal de las neuronas nigrales por dos mecanismos: primero, la pérdida de la entrada inhibitoria hacia las neuronas del NST produce un incremento en su actividad y con ello el aumento en la liberación glutamatérgica hacia las neuronas de salida. Segundo, la inhibición de las neuronas palidales tiene un efecto directo desinhibidor sobre las neuronas de salida. La consecuencia del incremento en la actividad de las neuronas de salida será una mayor inhibición de las neuronas blanco de los ganglios basales: tálamo, SC y núcleo tegmental pedúnculo pontino (Bolam et al., 2000)

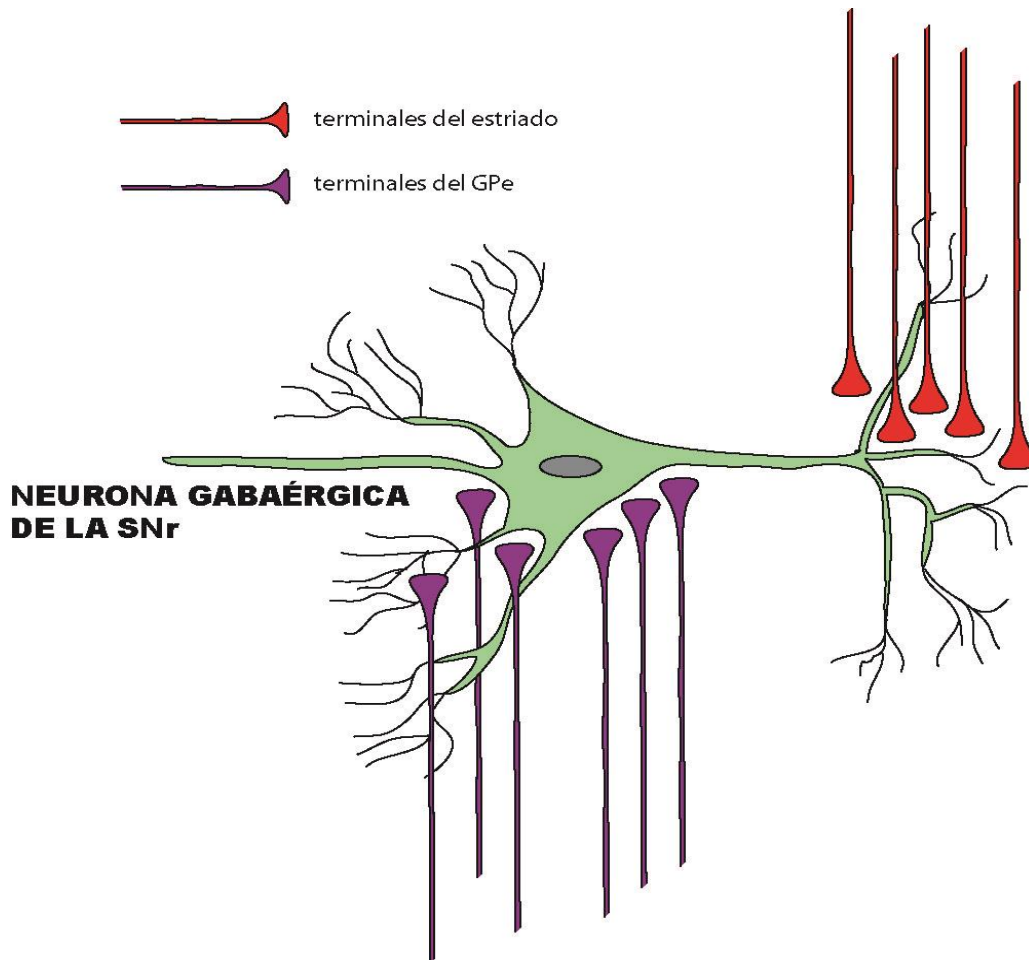


Figura 2: Distribución de las entradas GABAérgicas estriado-nigral y pálido-nigral hacia las neuronas de la SNr. (esquema modificado o basado de Nambu 2007).

También es necesario señalar que las sinapsis estriado-nigral y pálido-nigral están dotadas con distintas capacidades que sirven de sus respectivas funciones. La entrada directa estriado-nigral sirve para inhibir el disparo espontáneo a alta frecuencia de las neuronas GABAérgicas de la SNr y por lo tanto liberar al circuito motor tálamo-cortical y

al núcleo motor del tallo cerebral de la inhibición tónica, lo que permite que el movimiento se produzca (Chevalier y Deniau, 1985; Hisosaka et al., 2000). En condiciones basales, las neuronas estriado-nigrales están en gran medida silentes, y asincronizadas, la salida inhibitoria esporádica hacia las neuronas GABAérgicas de la SNr es probablemente ineficaz en la inhibición de estas neuronas, especialmente porque estas sinapsis están a menudo en las dendritas distales, permitiendo que las neuronas GABAérgicas de la SNr disparen a alta frecuencia. Cuando su comportamiento es importante, la entrada glutamatérgica convergente de la corteza y el tálamo fuertemente activan a las neuronas estriado-nigrales, la salida inhibitoria sincronizada hacia las neuronas GABAérgicas de la SNr es más eficaz en la inhibición de estas neuronas. La naturaleza facilitadora de la sinapsis estriado-nigral aumenta más esta inhibición. La función precisa de la entrada del GPe y su papel dentro de la vía indirecta es menos clara. Sin embargo, parece que la poderosa sinapsis pálido-nigral está normalmente deprimida permitiendo que las neuronas GABAérgicas de la SNr disparen a alta frecuencia (Zhou et al., 2011). La sinapsis pálido-nigral está más debilitada por la activación tónica de los receptores dopaminérgicos D2-like que presinápticamente disminuyen la entrada GABAérgica pálido-nigral (Aceves et al., 2011). Cuando conductualmente es necesario, sin embargo, la sinapsis pálido-nigral se activa para inhibir a las neuronas GABAérgicas de la SNr. Además, Connelly et al 2010 encontró que después de una breve pausa (~2 s) esto ocurre en las neuronas del GPe en eventos motores relacionados, la sinapsis pálido-nigral se recupera en toda su fuerza. Por lo tanto, parece que la sinapsis pálido-nigral está normalmente en un estado deprimido que permite el disparo a alta frecuencia de las neuronas de la SNr, pero pueden ejercer una poderosa influencia sobre cualquier incremento al activarse el GPe (Celada et al., 1999; Connelly et al., 2010).

2.2 PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS DE LA SNr

Hay dos tipos de neuronas en la SNr, neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas. El tipo más común son las neuronas GABAérgicas (85%) que son típicamente multipolares u ovoides, redondas o triangulares. El resto de las neuronas son dopaminérgicas (15%) de forma multipolar (Poirier et al., 1983; Shen y Johnson, 1997).

Para análisis electrofisiológicos en la SNr es crítico diferenciar entre neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas. Afortunadamente, estos dos tipos neuronales muestran distintas características electrofisiológicas y morfológicas. Los criterios electrofisiológicos para diferenciar las neuronas GABAérgicas de las dopaminérgicas son los siguientes:

PATRÓN Y FRECUENCIA DE DISPARO DE POTENCIALES DE ACCIÓN ESPONTÁNEOS: las neuronas GABAérgicas disparan a altas frecuencias mientras que las dopaminérgicas disparan a bajas frecuencias (Figura 3).

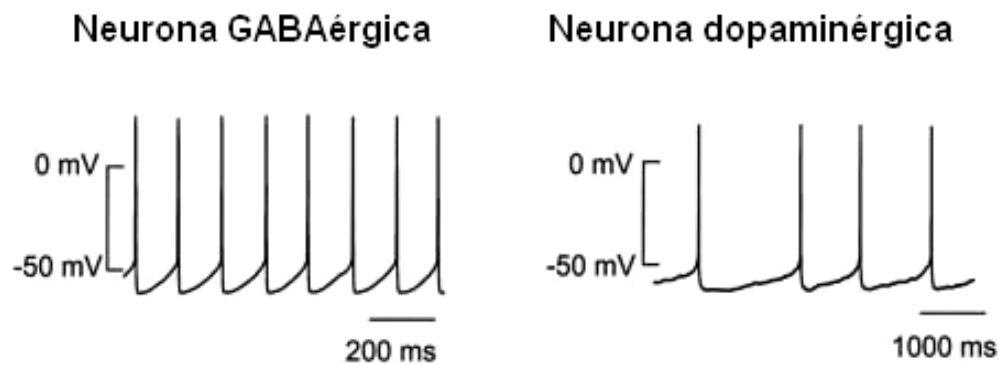


Figura 3: Registro del potencial de membrana de una neurona GABAérgica y una dopaminérgica. Ambas células disparan potenciales de acción espontáneos de manera regular pero a diferentes frecuencias (GABAérgica: 10.4 Hz; dopaminérgica: 0.8 Hz). (Wallmichrath y Szabo, 2002).

CORRIENTE ENTRANTE ACTIVADA POR HIPERPOLARIZACIÓN (SAG): solamente las neuronas dopaminérgicas presentan una corriente entrante activada por pulsos hiperpolarizantes, las neuronas GABAérgicas no lo presentan (Figura 4). Esta corriente también llamada I_h parece ser debido a una corriente catiónica no específica.

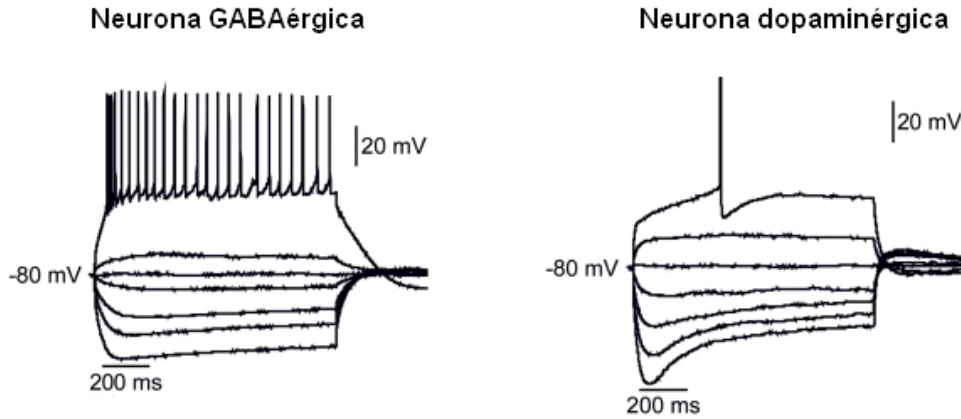


Figura 4: Respuesta de una neurona GABAérgica y dopaminérgica a pulsos de inyección de corriente hiperpolarizante y despolarizante. Se puede notar la rectificación entrante mostrada por la neurona dopaminérgica ante pulsos hiperpolarizantes y la ausencia de esta en la neurona GABAérgica. (Ibáñez et al., 2006).

DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN: las neuronas GABAérgicas muestran una duración del potencial de acción corto, en cambio en las neuronas dopaminérgicas la duración del potencial de acción es más extenso debido a la activación de una corriente de calcio (Yung et al., 1991). (Figura 5).

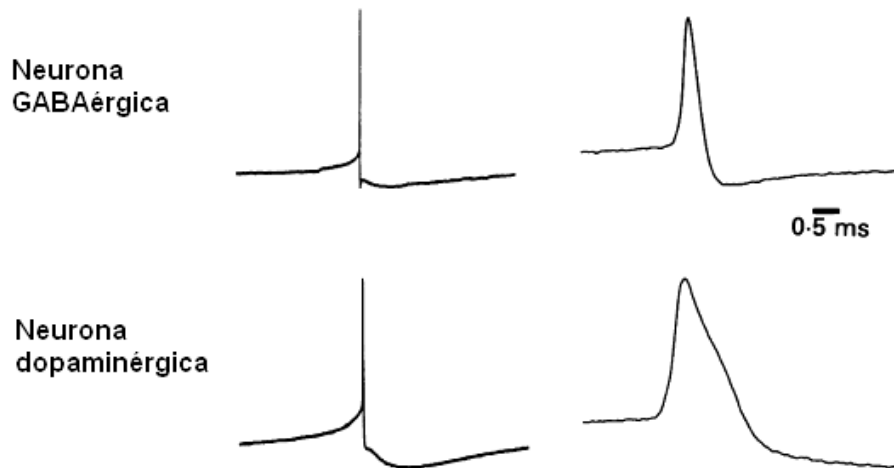


Figura 5: Comparación de potenciales de acción únicos de una neurona GABAérgica (0.8 mseg) y dopaminérgica (2 mseg).

TRANSMISIÓN GABAÉRGICA DE LA SNr

La neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso central de los mamíferos está modulada principalmente por los neurotransmisores GABA y glicina. La activación de sus receptores abre canales iónicos intrínsecos. En el SNC del adulto la activación de estos receptores-canales produce una entrada de cloro, que hiperpolariza la neurona y además inhibe la actividad neuronal. En años recientes, algunos reportes han dado a conocer la localización ultraestructural de los receptores GABA_A en los ganglios basales y esto ha permitido entender la neurotransmisión GABAérgica en estos núcleos. Tres diferentes tipos de receptores GABAérgicos han sido identificados sobre la base de su farmacología y electrofisiología. Los receptores GABA_A y los GABA_C son canales de cloro, mientras que los receptores GABA_B son receptores acoplados a proteínas G. Debido a que se van a medir conductancias de cloro por la apertura de los receptores GABA_A en las neuronas GABAérgicas de la SNr se mencionarán algunas características importantes de este tipo de receptores.

RECEPTORES GABA_A

La respuesta inhibitoria rápida característica de la neurotransmisión GABAérgica está mediada por la activación de receptores GABA_A, que son canales de cloro de cinco subunidades activados por ligando. Las subunidades del receptor GABA_A caracterizadas hasta ahora son $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 4$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$, $\rho 1$ - $\rho 3$, δ , ϵ , θ , π ; y sus combinaciones resulta en específicos perfiles fisiológicos y farmacológicos. La estequiometría más común del receptor GABA_A son dos subunidades α , dos β y una γ . La localización ultraestructural de las subunidades del receptor GABA_A en la sustancia negra parte reticulada son: $\alpha 1$, $\beta 2/\beta 3$ y $\gamma 2$ (Fujiyama et al., 2002). Varias propiedades comunes caracterizan la localización sináptica de los GABA_A en los ganglios basales: (1) Una gran proporción de subunidades $\alpha 1$, $\beta 2/3$ y $\gamma 2$ están localizados en sinapsis simétricas que en muchos casos han sido claramente identificadas como GABAérgicas. (2) Las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2/3$ y $\gamma 2$ a menudo colocalizan a nivel de sinapsis individuales. (3) Las subunidades del receptor GABA_A están

localizadas a niveles extrasinápticos. (4) Las subunidades no son expresadas en sinapsis asimétricas (glutamatérgicas) (Galván et al., 2006).

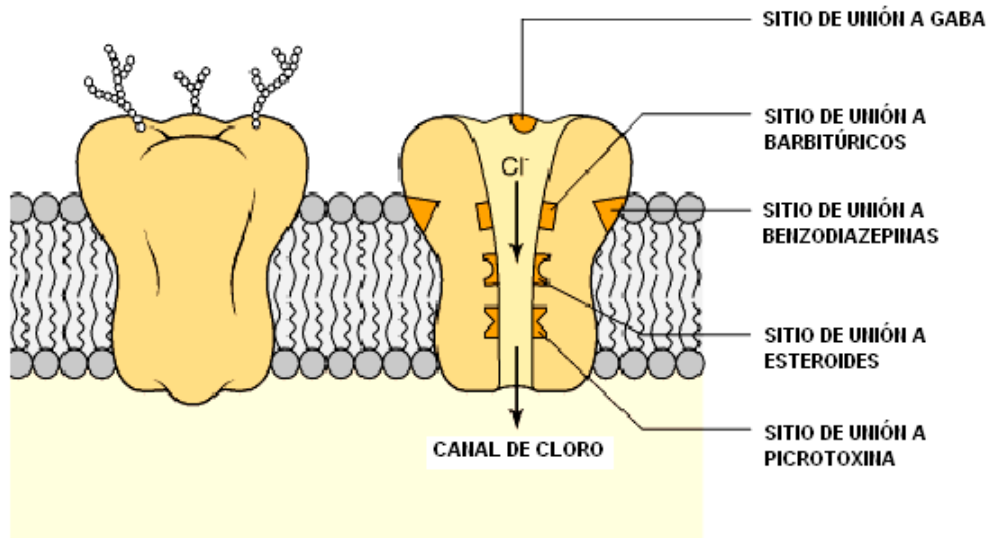


Figura 6: Modelo estructural del receptor GABA_A. Se pueden ver los diferentes sitios de unión de barbitúricos, benzodiazepinas, esteroides y picrotoxina (potenciadores de la apertura del canal) y de su ligando endógeno GABA. (Modificado de Siegel et al., 1999).

PROPIEDADES FUNCIONALES: Los receptores GABA_A muestran una secuencia de permeabilidad como sigue $SCN^- > I^- > Br^- > Cl^- \gg F^-$. También son permeables a los iones bicarbonato. El diámetro del poro es de 5.6 Å. El análisis de canales unitarios muestra tres diferentes estados de apertura de 0.5, 2.6 y 7.6 ms de duración (Bormann et al., 1987).

FARMACOLOGÍA: La farmacología de los receptores GABAérgicos es muy compleja y depende de las subunidades que formen al receptor. Los fármacos que interactúan con receptores GABAérgicos pueden ser divididos en antagonistas y potenciadores. Los primeros actúan como convulsivos, mientras que los segundos deprimen el SNC y son clínicamente usados como sedativos, anestésicos y anticonvulsivos. Los receptores GABA_A son selectivamente activados por muscimol. A diferencia de los receptores a glicina, su actividad puede ser potenciada por benzodiazepinas, barbitúricos, anestésicos, alcohol y algunos esteroides. Estas drogas no se unen al sitio de unión de

GABA, actúan incrementando el tiempo de apertura del canal ó aumentando la frecuencia de los canales abiertos. Picrotoxina es un inhibidor no competitivo que reduce la actividad del canal, se une a un sitio diferente del sitio de unión de GABA. El mecanismo de acción de la picrotoxina no está completamente entendido. En contraste, la bicuculina actúa como un antagonista competitivo uniéndose al sitio de unión de GABA cerrando el canal (Jentsch et al., 2002) Ver figura 6.

3. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1, D3 Y D4 EN LA SNr

De acuerdo a las secuencias de aminoácidos, similitudes estructurales y farmacológicas, los cinco receptores a dopamina están agrupados en dos familias. La familia D1-like que incluye los receptores D₁ y D₅, y la familia D2-like que incluye los receptores D₂, D₃ y D₄; todos estos receptores son de siete dominios transmembranales y están acoplados a proteínas G (Figura 7) (Nestler et al., 2001). Ya que se estudiarán solamente el papel de los receptores D1, D3 y D4, se mencionarán algunas de sus propiedades importantes.

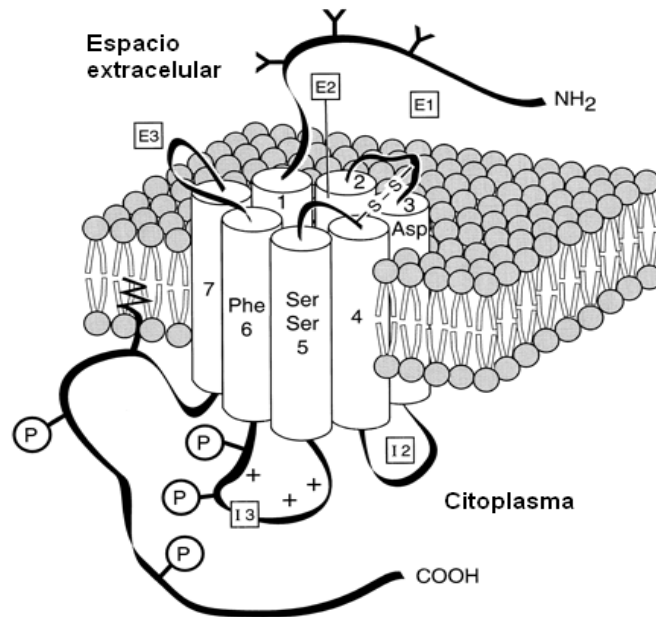


Figura 7: Estructura del receptor a dopamina: las características del receptor D1-like son representadas. El receptor D2-like está caracterizado por un carboxilo terminal corto y por su tercera asa intracelular grande. Los residuos involucrados en la unión de la dopamina están señalados en los dominios transmembranales. Los sitios potenciales de fosforilación están representados en la tercera asa intracelular (I3) y sobre el carboxilo terminal. Los sitios potenciales de glicosilación están representados en el amino terminal. E1-E3 son las aspas extracelulares, 1-7 son los dominios transmembranales, I2-I3 son las aspas intracelulares. (Tomado de Missale et al., 1998).

2.1 RECEPTOR D1

EXPRESIÓN: El receptor D₁ es el receptor dopaminérgico más abundante en el sistema nervioso central (SNC). Su ARNm ha sido encontrado en el estriado, núcleo acumbens y tubérculo olfatorio. También han sido detectados en el sistema límbico, hipotálamo y tálamo. Por otro lado, se ha encontrado la proteína del receptor D₁ en otras áreas tales como el globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada (núcleos de salida de los ganglios basales), pero no el ARNm. Esto sugiere que en esas áreas el receptor D₁ esté presente de manera presináptica (Dearry et al., 1990; Fremeau et al., 1991; Weiner et al., 1991).

En estudios neuroquímicos realizados en la SNr se encontró que el antagonista de los receptores D1 SCH 23390 bloqueó casi por completo el aumento de la liberación de

[³H] GABA producido por dopamina, mientras que el antagonista de los receptores D2/D3 el sulpiride no bloqueó el aumento de la liberación de [³H] GABA producido por dopamina, estos hallazgos demostraron que los receptores D1 pero no los D2 y D3 tienen la función de aumentar la liberación de [³H] GABA en la SNr (Florán et al., 1990).

Por otra parte, en estudios electrofisiológicos realizados en rebanadas cerebrales de neonatos utilizando la SNr se encontró que al activar los receptores D1 por su agonista SKF 38393 aumentó la frecuencia de las mIPSCs pero no su amplitud, lo cual sugiere que su localización es presináptica en la SNr (Radnikow y Misgeld, 1998).

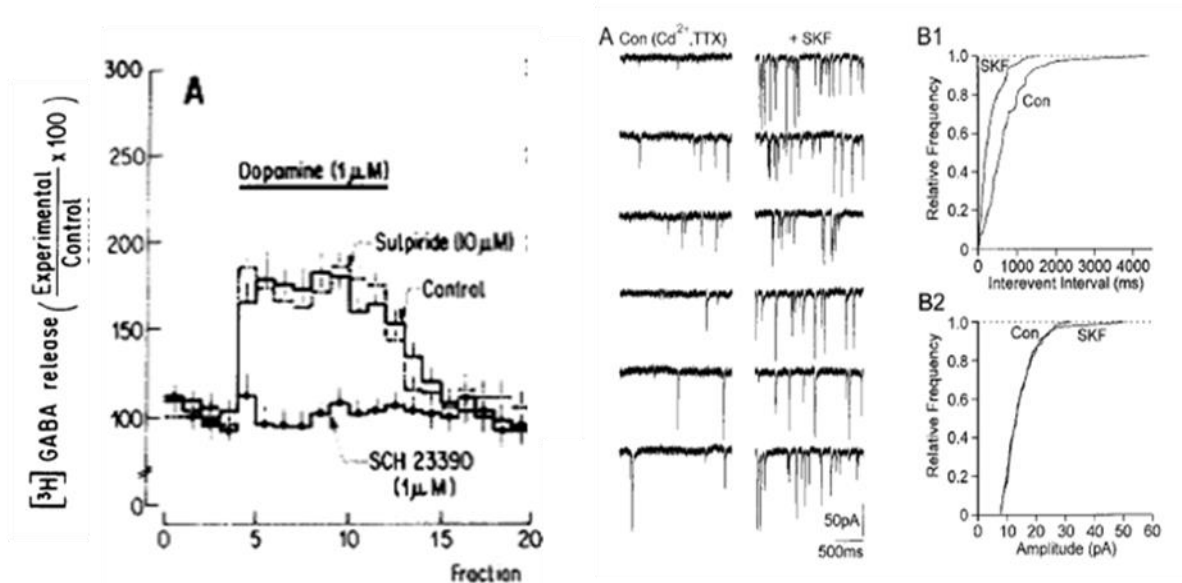


Figura 8: La activación de los receptores D1 aumenta la transmisión GABAérgica en la SNr. (Florán et al., 1990; Radnikow y Misgeld 1998).

SEÑALIZACIÓN CELULAR: Los receptores D₁ activan a la adenilato ciclasa a través de las proteínas G_s y G_{olf}. El aumento en los niveles de AMPc citosólico permite la activación de la proteína dependiente de AMPc (PKA) y con ello la fosforilación de varios blancos intracelulares: (1) la fosfoproteína de función dual regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32), un potente inhibidor de la proteína fosfatasa-1 (PP1) que controla el estado

de fosforilación de otras proteínas (Svenningsson et al., 2004), (2) Canales de calcio tipo L permitiendo la apertura del canal y con ello la entrada de Ca^{2+} a través del canal (Gao et al., 1997; Surmeier et al., 1995), (3) el factor transcripcional CREB que regula síntesis de proteínas requeridas para la memoria a largo plazo en la corteza prefrontal (Hotte et al., 2006). Otra de las vías caracterizadas por el receptor D_1 es la activación de PLC que produce la hidrólisis del fosfatidilinositol, 4-5 difosfato generando diacilglicerol (DAG) e IP_3 , el IP_3 activa al receptor IP_3 y libera Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Tang et al., 2004). Ver Figura 9.

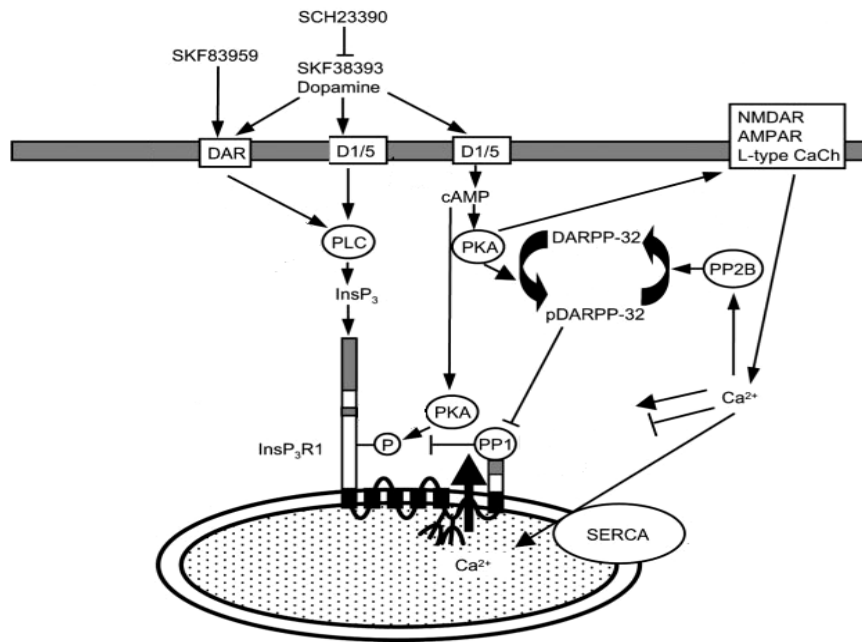


Figura 9: Señalización del receptor D_1 . La aplicación de dopamina activa los receptores D_1/D_5 , provocando la activación de la adenilato ciclasa, producción de AMPc, y activación de PKA. Las acciones de dopamina pueden ser mimetizadas por los agonistas específicos de los receptores D_1 el SKF38393 y prevenida por el antagonista SCH23390. La PKA fosforila a DARPP-32, convirtiéndola en un potente inhibidor de PP1. La activación de PKA y la inhibición de PP1 produce un incremento en la fosforilación y activación de los canales de Ca^{2+} tipo L (CaCh), receptores NMDA (NMDAR), receptores AMPA (AMPA) y receptores IP_3 (InsP3R1). La dopamina también actúa sobre receptores D_1 unidos a PLC formando IP_3 y DAG, el IP_3 activa al receptor IP_3 y la salida de Ca^{2+} de almacenes intracelulares. Este efecto de dopamina es mimetizado por el agonista de los receptores D_1 unidos a PLC el SKF83859. Un incremento del Ca^{2+} citosólico activa a la calcineurina (PP2B), que defosforila a DARPP-32 y desinhibe a PP1, que a su vez defosforila al receptor IP_3 y a los canales de Ca^{2+} tipo L. Los canales de Ca^{2+} tipo L, receptores NMDA, receptores AMPA y la SERCA son necesarios para prevenir la depleción de Ca^{2+} citosólico (Tomado de Tang et al., 2004).

2.4.2 RECEPTOR D_4

La localización anatómica y las propiedades farmacológicas del receptor D_4 lo hacen interesante como un posible blanco de drogas neurolepticas.

ESTRUCTURA GENÉTICA: El gen humano del receptor D₄ contiene un número de polimorfismos localizados en el tercer exón del gen que codifica la tercera asa citoplasmática del receptor. Este polimorfismo consiste en un número variable de tandas repetidas (VNTR) de una secuencia de 48 pares de bases que se repiten desde dos hasta 10 veces, indicados como receptores a dopamina desde D4.2 hasta D4.10. (Oak et al., 2000). Ver Figura 10

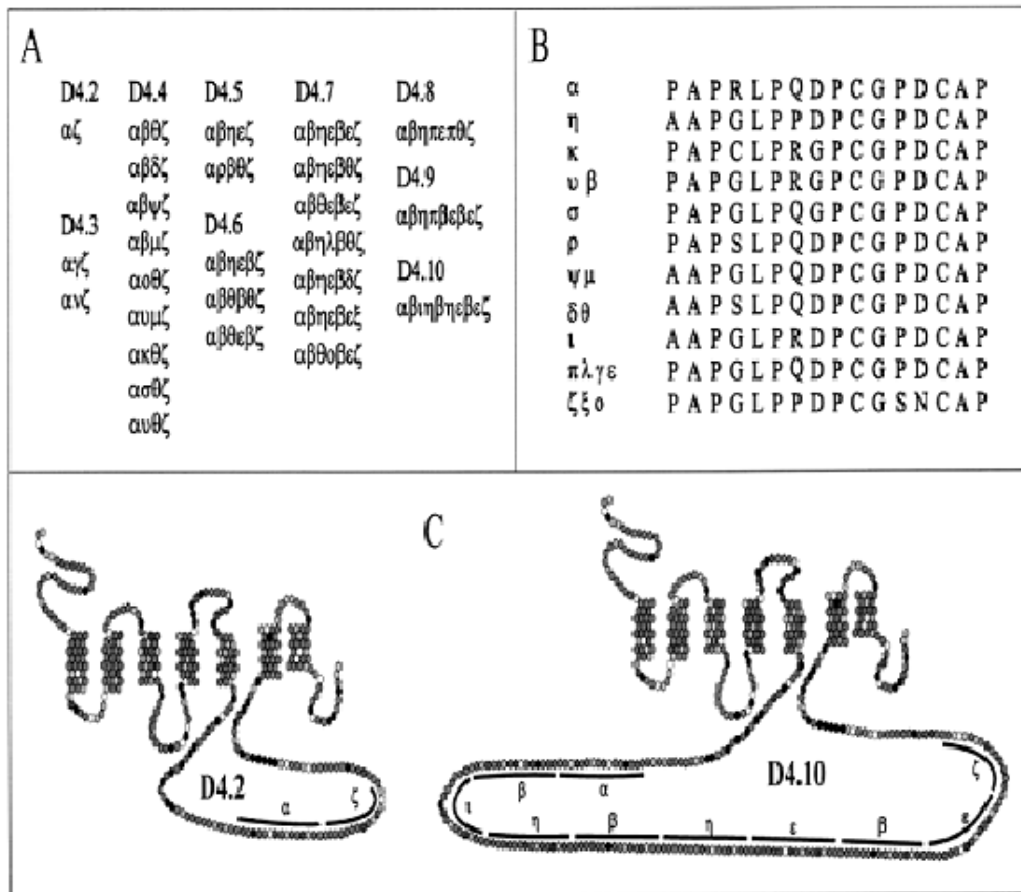


Figura 10: Representación esquemática de las variantes polimórficas del exón 3 VNTR que ha sido identificadas hasta ahora para el gen humano del receptor D₄ (DRD₄). (A) Varios haplotipos de acuerdo a la longitud (repetición de las 48 pb). Las letras griegas identifican las variantes de la secuencia de las 48 pb repetidas encontradas dentro del DRD₄ VNTR. (B) La secuencia de los 16 aminoácidos codificados por las diferentes secuencias de las 48 pb. (C) Trazo en forma de serpiente de las variantes del receptor dopaminérgico D₄ con el exón 3 VNTR corto y elongado (receptor D4.2 y D4.10 respectivamente). (Tomada de Jovanovic et al., 1999).

EXPRESIÓN: La expresión del receptor D₄ dopaminérgico es más abundante en retina, corteza cerebral, amígdala, hipotálamo y pituitaria, pero escaso en los ganglios basales. La expresión de receptores D₄ dopaminérgicos no está confinado únicamente en el SNC. Una expresión significativa ha sido observada en el atrium cardiaco, linfocitos y en los túmulos colectores corticales y medulares del riñón (Sun et al., 1998).

SEÑALIZACIÓN CELULAR: En sistemas de expresión heteróloga, se ha reportado que los receptores D₄ : (1) inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (Asghari et al., 1995; Watts et al., 1999), (2) activa canales de potasio rectificadores entrantes activados por proteínas G GIRK1 (Kir3) (Pillai et al., 1998), (3) bloquea canales de Ca²⁺ tipo L (Kazmi et al., 2000), (6) activa a ERK1 y 2 (Oak et al., 2001).

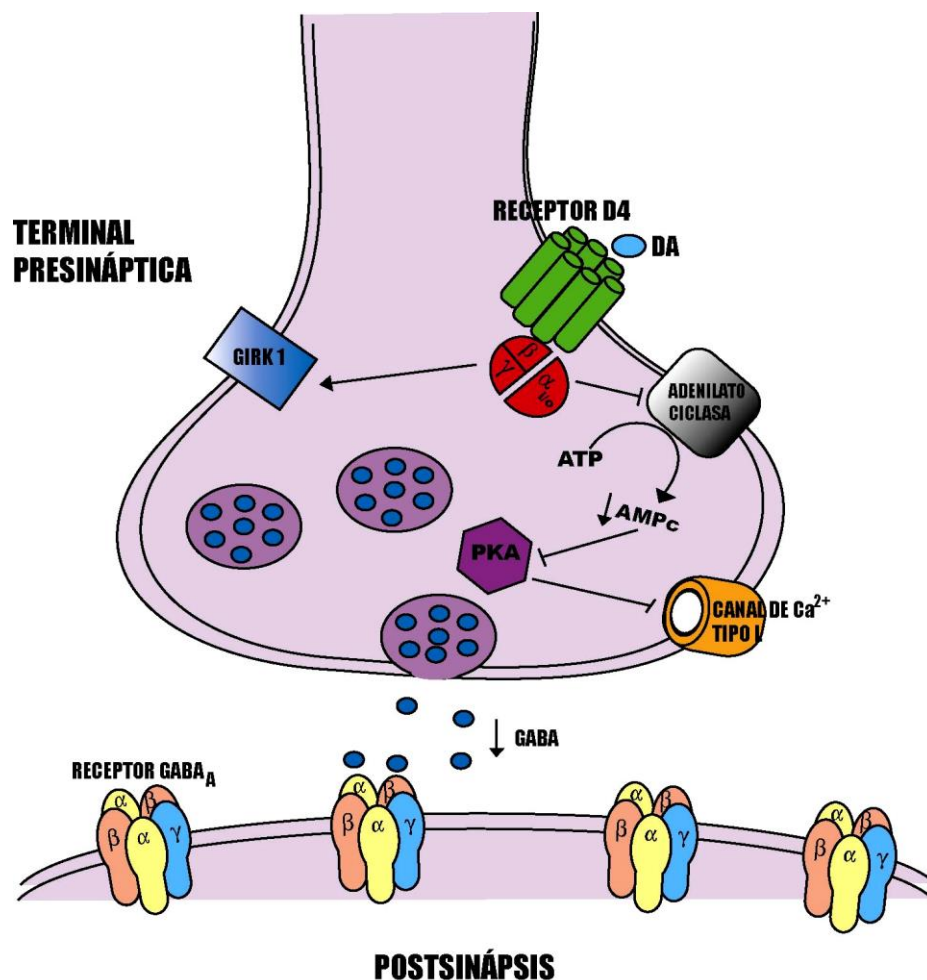


Figura 11: Señalización del receptor D₄ dopaminérgico. (Vías de señalización tomada de Oak et al., 2000; Wong et al., 2002)

4. INTERACCIÓN DE RECEPTORES D1/D3

Los receptores acoplados a proteínas G han sido clásicamente considerados como entidades monoméricas y que su señalización implica la activación secuencial de las proteínas G y enzimas específicas o canales efectores. Sin embargo, la evidencia acumulada en los últimos años hace a este modelo demasiado simple para explicar la flexibilidad funcional de estos receptores. El punto de vista actual de los receptores acoplados a proteínas G asume, de hecho, que estos receptores pueden formar heterómeros por interacción directa con miembros de la misma familia de receptores y con familias estructuralmente y funcionalmente divergentes de receptores (Ferré et al., 2009; Milligan, 2009). En algunos casos la heterodimerización es un requisito indispensable para la formación de receptores funcionales, por ejemplo, los receptores GABA_B, del gusto y receptores $\alpha 1b$ y $\alpha 1d$ (heterodímeros obligados). Por otra parte, los heterómeros no-obligados, que muestran características farmacológicas y funcionales específicas, podrían representar nuevas unidades de receptores. La heterodimerización a menudo afecta las propiedades de unión al ligando de los receptores que interaccionan y altera la potencia de los agonistas en la generación de las señales intracelulares. Al influir en la especificidad de la proteína G, la heterodimerización puede ser responsable de alteraciones en las vías de señalización activadas por un determinado receptor (Terrillon y Bouvier, 2004). En particular, un incremento sinérgico de señalización puede ocurrir cuando ambos agonistas están presentes (Terrillon y Bouvier, 2004), o la señalización puede ser atenuada cuando socios dentro de los heterodímeros interaccionan negativamente (Ginés et al., 2000). Los receptores que interactúan también pueden mostrar un acople específico a la proteína G y activar vías de transducción peculiares (Hasbi et al., 2010).

Aunque los receptores D1 y D2 están en su mayoría segregados en las neuronas estriado-nigrales y estriado-palidales respectivamente se ha demostrado que los receptores D1 y D3 están altamente co-localizados en las neuronas estriado-nigrales (Guillin et al., 2001; Sokoloff et al., 2006) y hay una creciente evidencia de que estos receptores pueden

interactuar entre sí. La estimulación de los receptores D1 induce, de hecho, la expresión del ARNm del receptor D3 en el estriado de la rata (Bordet et al., 2000; Guillin et al., 2001) y la coactivación de los receptores D1 y D3 en el centro del núcleo accumbens sinérgicamente aumenta la expresión del gen de la sustancia P (Schwartz et al., 1998; Ridray et al., 1998).

El receptor D3 está fisiológicamente concentrado en el estriado ventral donde está co-localizado con el receptor D1 en las neuronas espinosas medianas (Schwartz et al., 1998). Por otra parte, un aumento significativo de la expresión del receptor D3 en las neuronas estriado-nigrales que expresan el receptor D1 ha sido reportado en modelos experimentales de sensibilización conductual (Bordet et al., 2000; Guillin et al., 2001). El papel del receptor D3 en la regulación de la actividad locomotora ha sido durante mucho tiempo controversial, ya que hasta hace poco había sido atribuido a la activación de receptores D2 postsinápticos. Este paradigma se ha aclarado recientemente mediante el uso de reserpina que, al agotar la dopamina permite aislar mecanismos postsinápticos. Con este enfoque fue posible demostrar que la estimulación de los receptores D3 potencia la actividad locomotora mediada por el receptor D1 (Marcellino et al., 2008). La potenciación de las respuestas mediada por el receptor D1 fue de hecho contrarrestada por los antagonistas específicos de los receptores D3 y fue indetectable en ratones knock-out del receptor D3. Este sinergismo conductual de los receptores D1-D3 probablemente se produce a nivel de una sola neurona estriatal, y se ha sugerido que es mediado por un heterómero D1-D3 (Marcellino et al., 2008). Mediante el uso de diferentes enfoques experimentales esto ha sido, de hecho, recientemente reportado que los receptores D1 y D3 interactúan directamente tanto en células transfectadas y membranas estriatales para formar un heterómero con diferentes propiedades funcionales de las de los homo-oligómeros de los receptores D1 y D3 (Marcellino et al., 2008; Fiorentini et al., 2008). Los estudios de unión tanto en células transfectadas y membranas estriatales mostraron que una de las características del heterómero D1-D3 es una interacción sinérgica ya que la estimulación del receptor D3 incrementa la afinidad por dopamina y los agonistas selectivos de los receptores D1 para el receptor D1 (Marcellino et al., 2008; Fiorentini et al., 2008). Esta propiedad encuentra una implicación funcional en la modulación de la señalización del

receptor D1. Es bien conocido que el receptor D1, al interactuar con las proteínas Gs/Golf, activa la adenilato ciclasa, mientras que el receptor D3 interacciona con proteínas Gi/Go para inhibir la formación de AMPc. Interesantemente, la dopamina estimulaba la formación de AMPc con una potencia más alta en células que expresaban el heterómero D1-D3 que en células que expresaban solamente el receptor D1 (Fiorentini et al., 2008), lo que sugiere que la heterodimerización resulta en la potenciación de la activación de la AC mediada por el receptor D1. Una función del complejo D1-D3 puede por lo tanto ser que permita un fuerte acople estimulador del receptor D1 a la AC.

La heterodimerización D1-D3 también representa un nuevo mecanismo por el que los receptores D1 y D3 ejercen un control recíproco sobre la desensibilización del receptor inducido por agonista. Se ha establecido claramente que los receptores D1 y D3 diferencialmente reaccionan a la estimulación del agonista. En particular, mientras que los receptores D1 sufren secuestro citoplásmico y rápido reciclaje a la membrana plasmática (Oakley et al., 2000), la desensibilización de los receptores D3 está principalmente mediada por una disminución en el acople de proteína G y una señalización deficiente con solamente cambios marginales en los niveles del receptor en la membrana plasmática (Kim et al., 2005). Interesantemente, la heterodimerización D1-D3 resulta en la pérdida del secuestro citoplásmico del receptor D1 inducido por el agonista. Por otro lado, la estimulación coincidente de ambos receptores dentro del heterómero D1-D3 ha sido mostrado que es capaz de co-internalizar ambos tipos de receptores D1 y D3, lo que sugiere que un mecanismo peculiar de desensibilización puede regular a los receptores D3 que son parte del complejo D1-D3 (Fiorentini et al., 2008). En particular como resultado de la dimerización, los receptores D3 se cambian a los mecanismos de tráfico típicos de los receptores D1.

5. ANTECEDENTES INMEDIATOS

En la década de los 90 diversos estudios inmunocitoquímicos realizados en los núcleos de los ganglios basales mostraron que los receptores D4 dopaminérgicos están expresados en altos niveles en el soma de las neuronas del GP, el estriado y la SNr (Mrzljak et al., 1996; Ariano et al., 1997; Mauger et al., 1998; Khan et al., 1998). Como su función hasta entonces era desconocida se procedieron a realizar estudios electrofisiológicos utilizando la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa. Lo que se encontró en el caso de las neuronas palidales fue que los receptores D4 son postsinápticos, ya que su activación reduce las corrientes postsinápticas GABAérgicas (Shin et al., 2003; Hernández et al., 2006). Un dato importante fue que la dopamina el ligando endógeno actúa sobre receptores D2 y no sobre receptores D4 presentes en las terminales estriado-palidales reduciendo la liberación de GABA en el GP (Shin et al., 2003; Cooper y Stanford 2001), lo que sugirió que probablemente estos receptores se encontraban presentes no en las neuronas del estriado sino en las terminales cortico-estriatales regulando la liberación de glutamato hacia el estriado (Berger et al., 2001). Ahora bien, el GP envía proyecciones GABAérgicas al Núcleo Subtalámico (NST), SNr y al Núcleo Reticular del Tálamo (NRT), por lo que podría esperarse que estos receptores D4 localizados en el soma de las neuronas palidales puedan ser transportados a las terminales y controlar la liberación de GABA hacia estos núcleos. De hecho, hallazgos inmunocitoquímicos dan indicio de esta suposición ya que la proteína del receptor D4 se encontró en las neuronas del NST, NRT y SNr (Flores et al., 1999; Mrzljak et al., 1996; Khan et al., 1998). A este respecto, experimentos de liberación de GABA tritiado han demostrado que los receptores D4 disminuyen la liberación de

GABA en el NST, NRT y SNr (Florán et al., 2004a; Florán et al., 2004b; Acosta et al., 2010). De igual modo, registros electrofisiológicos de patch clamp en la configuración de célula completa han mostrado que los receptores D4 son presinápticos y disminuyen la liberación de GABA en la SNr y NRT (Cruz-Trujillo 2008 datos no publicados; Gasca et al., 2010; Aceves et al., 2011). Por esta razón nuestro grupo de trabajo ha formado una línea de investigación que pretende entender el papel del receptor D4 sobre la modulación GABAérgica en los ganglios basales.

Ahora bien, la SNr recibe proyecciones GABAérgicas tanto del estriado y el GP por lo que se podría pensar que los receptores D4 presinápticos podrían estar en ambas proyecciones ó en una sola de ellas. Los estudios neuroquímicos establecen que los receptores D4 provienen de las proyecciones palidales y no de las estriatales, ya que la lesión del GP y no así la del estriado hace que se pierda el efecto inhibitor del receptor D4 sobre la liberación de GABA (Acosta et al., 2010). De la misma manera, los registros electrofisiológicos indican que los receptores D4 están presentes en las terminales palidales (Aceves et al., 2011). Por otra parte, se sabe que las aferencias estriado-nigrales

Dada la ubiquidad de los receptores D4 en los diferentes núcleos de los ganglios basales modulando la liberación de GABA, es posible que se trate de un sistema de receptores por los cuales la dopamina controla la actividad motora, lo cual podría ser importante para entender la participación de dopamina en procesos patológicos como el déficit de atención con hiperactividad primaria ó la enfermedad del Parkinson.

En estudios de RT-PCR en célula única, Surmeier y colaboradores en 1996 mostraron la colocalización del ARNm de los receptores D1 y D3 en una misma neurona GABAérgica del estriado. Así mismo en el 2008, Fiorentini y colaboradores mostraron que los receptores D1 coinmunoprecipitan con los receptores D3. Por otra parte, en estudios de nuestro laboratorio de síntesis de AMPc en sinaptosomas de terminales de la SNr se ha encontrado que la activación concomitante de los receptores D3 con su agonista selectivo potencia el efecto estimulador del SKF 38393 un agonista selectivo de los receptores D1,

sobre la formación de este mensajero. Estas evidencias sugieren que los receptores D1/D3 pueden estar formando heterodímeros funcionales, sin embargo, el papel que pueda estar desempeñando sobre la transmisión estriado-nigral no es muy claro todavía.

6. JUSTIFICACIÓN

Hay evidencias que sugieren que los receptores D1/D3 presentes en las terminales estriado-nigrales pueden estar formando heterodímeros funcionales. Hasta ahora el papel que puedan estar desempeñando no es muy claro, por lo que es determinante mostrar evidencias electrofisiológicas y farmacológicas que muestren las propiedades funcionales de la interacción D1/D3 en terminales estriado-nigrales en el control fisiológico de la actividad del estriado y su implicación patológica en el desarrollo de disfunciones motoras.

7. HIPÓTESIS

El receptor D3 de las terminales estriado-nigrales por si solo no modula la liberación de GABA, no obstante, potencia el efecto estimulador del receptor dopaminérgico D1 al formar el heterodímero funcional.

8. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la localización pre- ó postsináptica de los receptores D1, D3 y D4 en la SNr y su posible interacción al ser coactivados.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar la interacción de los receptores D1/D3 en las terminales estriado-nigrales al ser coactivados

Estudiar la interacción de los receptores D4/D3 en las terminales pálido-nigrales.

9. METODOLOGÍA

9.1 OBTENCIÓN DE REBANADAS

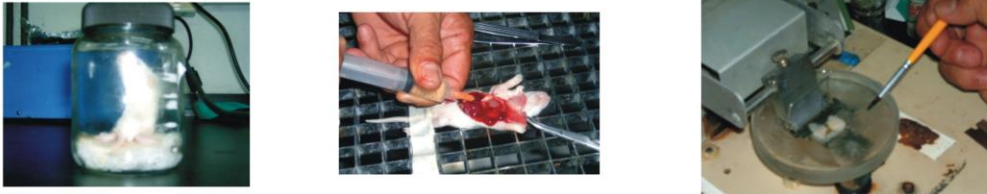
Se utilizaron ratas Wistar macho de 14-21 días de edad. Las ratas se colocaron dentro de un frasco para ser anestesiadas por inhalación de cloroformo. Después de esto, la rata es decapitada y se obtiene el cerebro lo más rápido posible, se deposita sobre una placa metálica colocada sobre hielo. Con una navaja se corta el cerebelo y se separan los hemisferios, estos se pegan con pegamento de cianocrilato en una caja petri, la cual se coloca sobre el soporte móvil de un vibratomo (Lancer, Technical Products Internacional Corp., St. Louis, MO). Se retira el exceso de pegamento y se adiciona la solución externa A fría hasta cubrir el tejido cerebral, y finalmente se obtienen rebanadas sagitales de 300 micrómetros de grosor.

Ya que se obtuvieron las rebanadas, estas se depositan en un vaso de precipitado que contiene la solución externa B (ver tabla 1) para que se estabilicen durante una hora (antes de iniciar el registro) a temperatura ambiente constantemente burbujeadas por una mezcla gaseosa de CO₂ (5%) y O₂ (95%). La solución B tiene una composición semejante al fluido cerebro-espinal.

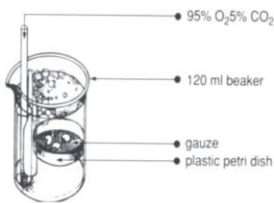
Después que paso la hora de estabilización se elige una rebanada que contenga el núcleo de interés, en este caso la sustancia negra parte reticulada (SNr) y se transfiere a una cámara de registro fijándola con un bastidor que contiene fibras de nylon transparente para que no se mueva la rebanada. La cámara de registro posteriormente se coloca en la platina

de un microscopio perfundiéndola a una velocidad de 1-2 ml por minuto con la solución externa B que también se mantiene con burbujeo constante con la mezcla gaseosa. Las neuronas de la SNr fueron visualizadas con un microscopio de luz infrarroja de contraste diferencial (IR-DIC) a través de un objetivo de inmersión en agua de 40X (Figura 12).

A



B



D



C

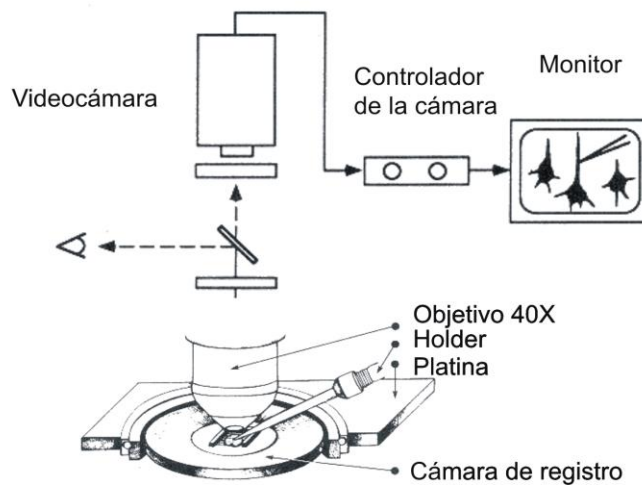


Figura 12: Obtención de la preparación y sistema de registro. Para el registro de corrientes postsinápticas espontáneas miniatura (mIPSCs) utilizamos la técnica de “*patch clamp*” en su configuración de “*célula completa*”. A: una rata Wistar macho se coloca dentro de un frasco para ser anestesiada mediante inhalación por cloroformo. Se decapita la rata y se obtiene el cerebro realizando rebanadas sagitales de 300 micrómetros de grosor. B: las rebanadas se dejan estabilizar una hora antes del registro, con un burbujeo constante de O₂ (95%) y CO₂ (5%), después se elige una rebanada que contenga la SNr. C: la rebanada se transfiere a una cámara de registro, la cual es colocada en la platina de un microscopio y mediante un objetivo de inmersión

en agua de 40X la imagen es proyectada a una videocámara y finalmente a un monitor de video. D: se elige una neurona para establecer la fijación de voltaje para registrar mIPSCs.

9.2 SOLUCIONES

La composición de las soluciones empleadas se muestra en la tabla 1. Las soluciones experimentales fueron preparadas a partir de soluciones madre al momento de ser utilizadas, y la solución interna fue filtrada con un filtro milipore de 0.22 μm . La solución externa se ajustó a un pH de 7.4 al ser burbujeada con una mezcla gaseosa de 95% de O_2 y 5% de CO_2 y utilizando un buffer de bicarbonatos, su composición varió de acuerdo a las condiciones del experimento. Mientras que para la solución interna (ver tabla 1) se utilizó HEPES como buffer y el pH se ajustó entre 7.27 – 7.3 con la ayuda de KOH ó CsOH, según el tipo de solución interna empleado, ya que la composición varió dependiendo de la condición experimental.

Tabla 1: Composición de las soluciones

EXTERNA		
	A	B
Colina-Cl	124	0
NaCl	0	124
KCl	2.5	2.5
MgCl ₂	1.3	1.3
NaHCO ₃	26.0	26.0
NaH ₂ PO ₄	1.2	1.2
Glucosa	10.0	10.0
CaCl ₂	2.4	2.4

INTERNA			
C		D	
KCl	16.0	CsCl	130.0
MgCl ₂	2.0	CaCl ₂	0.5
KSO ₃ CH ₃	120.0	MgCl ₂	2.0
HEPES	10.0	K ₂ EGTA	5.0
K ₂ EGTA	1.1	HEPES	10.0
ATP-Mg	1.1	ATP-Mg	4.0
	1.1	GTP-Na	1.0

En mM

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]

EGTA: Ácido etilen glicol-bis[β-aminoetileter]-N,N,N',N'-tetra acético

ATP: 5'-trifosfato de adenosina

GTP: 5'-trifosfato de guanosina

9.3 FÁRMACOS

Los fármacos utilizados son: 1 μM de tetrodotoxina (TTX, bloqueador de los canales de sodio); 30 μM de bicuculina (antagonista GABAA); 10 μM de CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), antagonista de los receptores AMPA-Kainato; 50 μM de AP-5 (D(-)-2-amino-5-phosponopentanoic acid, antagonista de los receptores NMDA; 100 nM de PD 168,077 (N-[[4-(2-cyanophenil)-1-piperazinyl]methyl]-3-methyl-benzamide maleate), agonista selectivo del receptor D4; 100 nM de L-745,870 (3-[[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H pyrrolo [2,3-b] pyridine) hydrochloride),

antagonista selectivo del receptor D4; 100 nM de SCH23390 (R(-)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride), antagonista selectivo del receptor D1; 50 nM de GR 103691 (4'-Acetyl-N-[4-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]butyl]-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide, antagonista selectivo de receptores D3; 3 μ M de SKF 38393 ((RS)-2,3,4,5, tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1H-3-epine hydrochloride, agonista de los receptores D1; 100 nM de PD 128,907 ((+)-(4aR,10bR)-3,4,4a,10b-tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano[4,3-b]-1,4-oxazin-9-ol hydrochloride, agonista selectivo de los receptores D3. Todos los fármacos fueron diluidos en la solución externa B hasta obtener la concentración requerida.

9.4 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

9.4.1 PIPETAS

Las pipetas utilizadas se fabricaron con capilares de borosilicato WPI PG52165-4 en dos etapas, primero las micropipetas fueron estiradas siguiendo un protocolo de dos pasos usando un estirador vertical DAVID KOPF 730 y posteriormente se pulieron mediante calor usando una microforja NARISHIGE MF-9. La solución interna con la que se llenan las micropipetas depende de la condición experimental; especificándolo en cada situación. Para determinar la resistencia de la micropipeta en el baño (solución de perfusión), se aplicó un pulso cuadrado de 5 mV de amplitud con 8 ms de duración, y se midió el valor de la respuesta en corriente, y de acuerdo a la ley de *Ohm* se obtuvo el valor de la resistencia, que fue de 4 a 8 M Ω .

9.4.2 REGISTRO

Los registros se obtuvieron usando la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa ("whole cell"), primero se realizaron registros intracelulares en la modalidad de fijación de corriente para identificar las neuronas y posteriormente en la modalidad de fijación de voltaje, para registrar las corrientes sinápticas (cabe resaltar que se registraron neuronas que contienen su árbol dendrítico y por tanto su capacitancia es difícil de compensar). La cámara de perfusión con la rebanada se colocó sobre la platina de un

microscopio Axioscop I (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) que tiene adaptada una videocámara Hamamatsu C2400-50 (Hamamatsu Photonics Systems, USA), la cual proyecta la imagen a un monitor TOSHIBA. Se usó un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments), una tarjeta de adquisición analógico-digital DIGIDATA 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA) operada a través del paquete Pclamp 7.0 (Axon Inst.) instalado en una computadora PC. Para el monitoreo del registro durante los experimentos se empleó un osciloscopio TEKTRONIX 2214.

La micropipeta fue implantada en la célula con ayuda de un micromanipulador pizoeléctrico. Se aplicó presión positiva en el interior de la micropipeta, lo cual permite limpiar la superficie de la neurona. Posteriormente se retira la presión positiva y se aplica presión negativa; lo cual permite la formación del gigasello, entre la pipeta y la membrana. Después de la formación del sello se aplicó una débil presión negativa para romper el segmento de la membrana contenido en la micropipeta, logrando así el registro en la configuración de célula completa.

9.5. REGISTRO EN LA CONFIGURACIÓN DE “CÉLULA COMPLETA”

La resistencia de entrada de las neuronas (R_e) y el patrón de disparo, fueron estimados al realizar registros en la configuración de “célula completa”, en fijación de corriente. Las propiedades eléctricas de membrana se determinaron utilizando la solución interna C (ver tabla 1), esta solución tiene una composición iónica semejante al contenido intracelular, lo cual no altera estas propiedades. Para ello se aplicó un protocolo de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante, lo que nos permite determinar la resistencia de entrada (R_e) y el patrón de disparo neuronal. Los pulsos aplicados en este protocolo fueron de una duración de 1 s, con un incremento de 20 pA.

Para obtener el valor de R_e , se hizo una relación entre la corriente aplicada con respecto al cambio de voltaje alcanzado; se utilizaron solo los pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes que no presentaron respuestas activas (potenciales de acción). Se graficaron los puntos en donde (X) es la corriente aplicada y (Y) el cambio de voltaje, estos puntos se

ajustaron a una línea recta, donde el valor de la pendiente correspondió al valor de R_e de la célula registrada, según la ley de *Ohm*:

$$\Delta V = R_e \times I$$

Donde: ΔV es el cambio del voltaje

R_e es la resistencia de entrada

I es la corriente aplicada

La frecuencia del disparo de potenciales de acción espontáneos de las neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas, se midió el intervalo inter-evento entre el primer y segundo potencial de acción. Considerando que la frecuencia es igual al recíproco del intervalo inter-evento (periodo), utilizamos la siguiente ecuación

$$F = 1 / \text{Intervalo inter-evento}$$

9.6 CORRIENTES MINIATURAS

Para realizar el registro de corrientes espontáneas miniatura se adicionó 1 μM de tetrodotoxina (TTX) al medio, con el objetivo de bloquear canales de sodio y como consecuencia eliminar los potenciales de acción de las terminales sinápticas, ya que por definición las corrientes espontáneas miniatura son independientes de corrientes de sodio, es decir, de potenciales propagados. Para realizar estos registros se utilizó la solución interna D (Ver tabla 1) que contiene un bloqueador de los canales de K^+ (Cs^+) con la finalidad de disminuir la caída electrotonica. Las corrientes registradas son espontáneas y dependen de la liberación cuántica del neurotransmisor; estos registros nos permiten detectar efectos farmacológicos sobre la liberación del neurotransmisor y sobre conductancias iónicas de las neuronas registradas, es decir, permiten detectar efectos pre- ó postsinápticos. La señal fue filtrada a 2 KHz; y el registro fue realizado en presencia de CNQX y SCH 23390 (antagonista de los receptores AMPA-Kainato y receptor D1 respectivamente). Al final del experimento siempre se adicionó bicuculina para demostrar que las corrientes registradas eran de naturaleza GABAérgica y mediadas por la activación del receptor GABA_A .

9.7 ANÁLISIS DE DATOS

Las corrientes postsinápticas espontáneas miniatura (mIPSCs), se analizaron empleando el programa comercial Minianalysis (Synaptosoft). El programa cuenta los eventos y una vez que se tiene el número de eventos, los clasifica en base a su valor de amplitud ó al intervalo inter-evento. Con los datos analizados se hicieron histogramas de frecuencia acumulada tanto para las amplitudes como para el intervalo inter-evento, de esta manera se aplicó la prueba Kolmogorov-Smirnov para el análisis estadístico y determinar el nivel de significancia entre la población de eventos control y bajo el efecto de los fármacos. La adquisición de los trazos se realizó a través de la adquisición digital comandada por el programa CLAMPEX 7.0.

10. RESULTADOS

10.1 IDENTIFICACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS EN LA SNr.

Antes de estudiar la interacción de los receptores D1, D3 y D4 presinápticos en las neuronas aferentes GABAérgicas de la SNr, procedimos primero a identificar a las neuronas GABAérgicas en este núcleo, ya que se conoce que en la SNr hay dos tipos de neuronas: las neuronas GABAérgicas que representan el 85% de la población neuronal y las neuronas dopaminérgicas que representan el 15% de la población (Fallon y Loughlin, 1995; Shen y Johnson, 1997). Estos dos tipos de neuronas muestran diferentes características electrofisiológicas que nos ayudan a diferenciarlas. Hay tres criterios electrofisiológicos que fueron previamente descritos para identificar a las neuronas GABAérgicas de las dopaminérgicas: 1) la frecuencia de disparo de potenciales de acción espontáneos repetitivos, 2) una corriente entrante activada por hiperpolarización (I_h) y 3) la duración del potencial de acción (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997).

Las neuronas GABAérgicas incluidas en este análisis (n=10) mostraron un disparo repetitivo de potenciales de acción espontáneos a altas frecuencias que van de 12.78-26 Hz con una media de 18.07 ± 1.28 Hz en el modo de fijación de corriente en reposo (Figura 13 A1). De acuerdo a la literatura esta propiedad distingue a las neuronas GABAérgicas de las dopaminérgicas (Nakanishi et al., 1987). Las neuronas dopaminérgicas presentes en la SNr tienen un disparo repetitivo de potenciales de acción a bajas frecuencias que van de 5.7-8.15 Hz con una media de 6.92 ± 1.22 Hz (Figura 13 B1). El potencial de reposo (en la cual la corriente de mantenimiento fue cero) de las neuronas GABAérgicas varió de -53 a -59 mV con una media -56.4 ± 0.58 mV y el de las neuronas dopaminérgicas varió de -47 a -55 mV con una media de -52.2 ± 1.59 mV (n=5).

La segunda característica previamente establecida para diferenciar a las neuronas GABAérgicas de las dopaminérgicas es la presencia de una corriente entrante activada por hiperpolarización llamada I_h ó sag (Stanford y Lacey, 1996). En nuestros registros en el modo de fijación de corriente al aplicar pulsos de corrientes hiperpolarizantes de 1 segundo de duración, las neuronas dopaminérgicas registradas muestran una pronunciada rectificación entrante (deflexión de voltaje) probablemente asociada a una corriente catiónica inespecífica. Ante pulsos despolarizantes presentaron un disparo regular de potenciales de acción pero a bajas frecuencias, ver Figura 13 B2. Por otro lado las neuronas GABAérgicas registradas en este estudio, al aplicarles pulsos de corriente hiperpolarizantes no mostraron esa deflexión de voltaje, o bien fue muy pequeña, sin embargo, al término de los pulsos hiperpolarizantes estas neuronas presentaron una postdescarga de potenciales de acción ó espigas de bajo umbral. Con pulsos despolarizantes presentaron un disparo un disparo regular de potenciales de acción pero con una frecuencia más alta que las neuronas dopaminérgicas, ver Figura 13 A2.

Otra de las características para diferenciar a estas neuronas es la duración del potencial de acción medido como la amplitud media (Richards et al., 1997). Las neuronas GABAérgicas (Figura 13 A3) presentaron una duración corta del potencial de acción y una rápida post-hiperpolarización (AHP) debido a la activación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (1.17 ± 0.09 ms; $n=10$), en contraste, las neuronas dopaminérgicas (Figura 13 B3) presentan una duración larga del potencial de acción (3.58 ± 1.0 ms; $n=5$) debido a la activación de corrientes de Ca^{2+} y una AHP de larga duración que requiere más de 1 segundo para regresar al potencia de reposo y generar otro potencial de acción, esto podría explicar por qué las neuronas dopaminérgicas disparan a bajas frecuencias en su potencial de membrana en reposo.

Estos resultados confirman la presencia de dos tipos de neuronas presentes en la SNr. De las 163 neuronas caracterizadas en este trabajo, 84% fueron GABAérgicas y 16% dopaminérgicas.

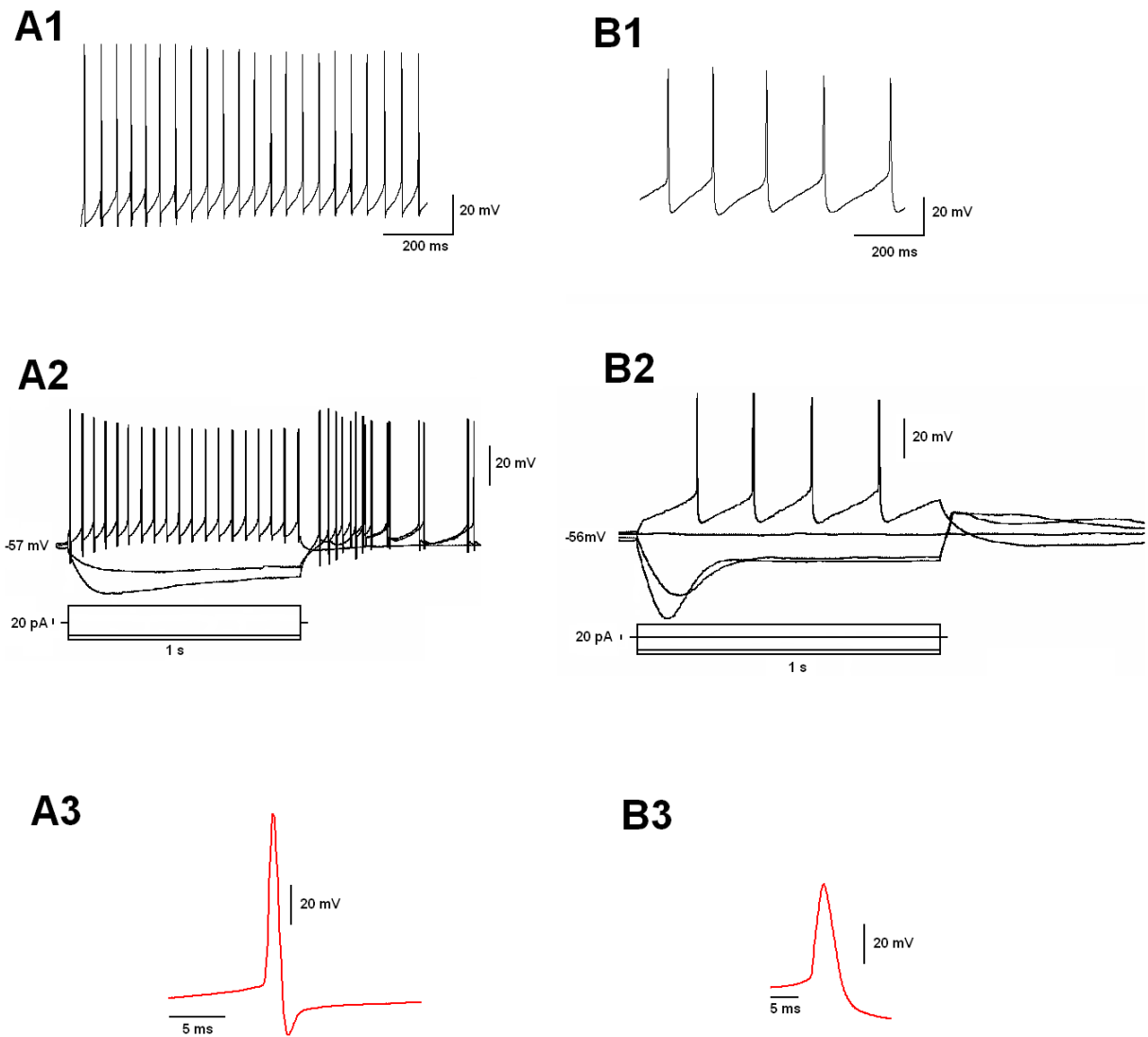


Figura 13: Identificación de las neuronas GABAérgicas en la SNr. Actividad espontánea de las neuronas en reposo. Las neuronas GABAérgicas (A1) disparan a altas frecuencias (28 Hz), mientras que las neuronas dopaminérgicas (B1) disparan potenciales de acción a bajas frecuencias (6 Hz). Respuesta de una neurona GABAérgica (A2) y una dopaminérgica (B2) a pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante. Nota la pronunciada rectificación entrante mostrada por la neurona dopaminérgica, mientras que en la neurona GABAérgica es ausente. Comparación de la duración de potenciales de acción espontáneos de una neurona GABAérgica (1 ms; A3) y una neurona dopaminérgica (4.58 ms; B3).

LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES D3 AUMENTA LA FRECUENCIA DE LAS mIPSCs GABAÉRGICAS SOLAMENTE CUANDO SON COACTIVADOS CON LOS RECEPTORES D1

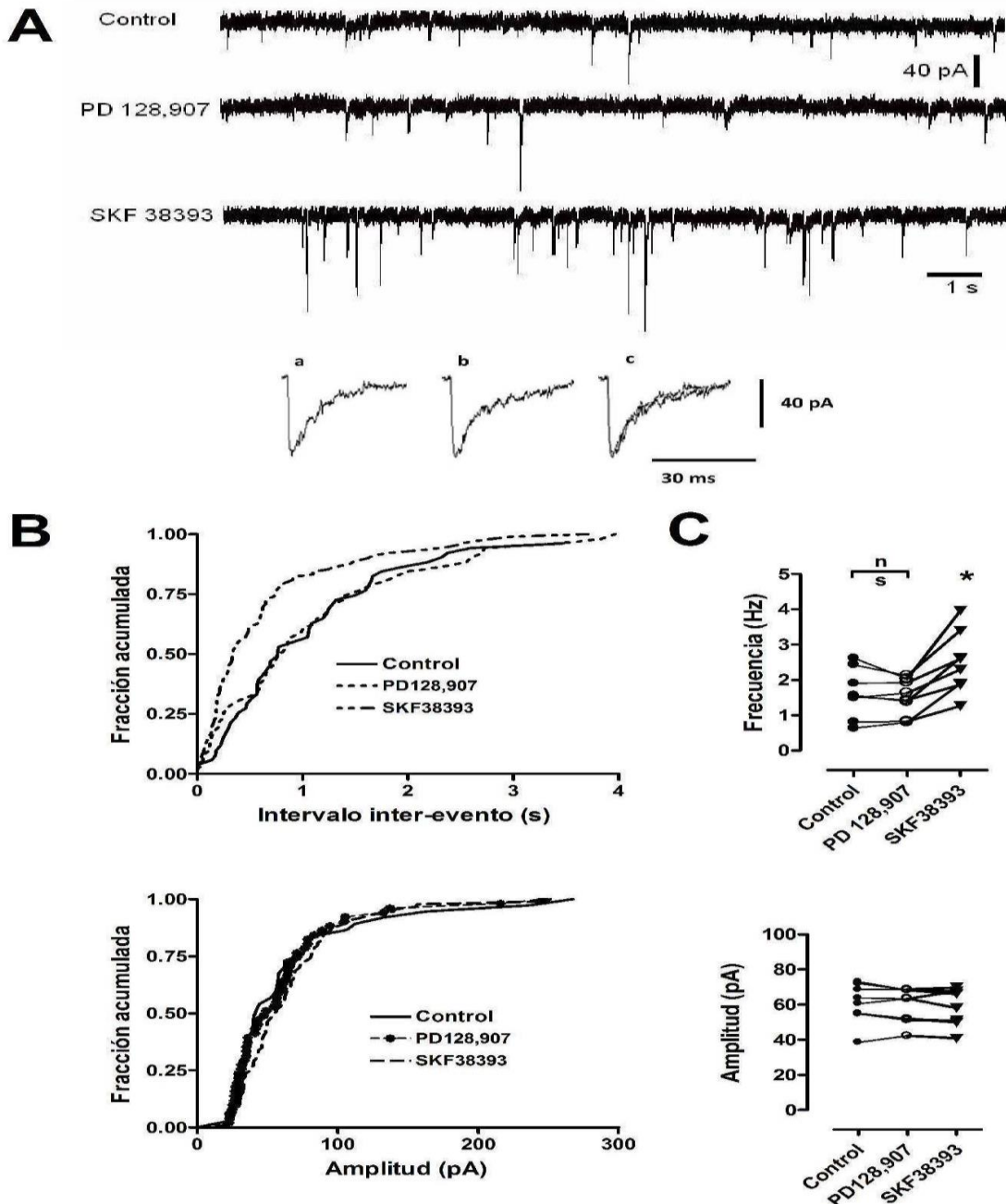


Figura 14: El agonista selectivo del receptor D3 el PD 128,907 administrado solo no modifica la liberación espontánea de GABA de las terminales presinápticas. A. trazos representativos de mIPSCs. El trazo superior fue registrado durante el periodo control. El siguiente trazo fue registrado durante la aplicación de 100 nM de PD 128,907. El último trazo fue registrado durante la aplicación separada del agonista selectivo de los receptores D1el SKF 38393 (3 μ M). El inserto son trazos extendidos que comparan los cursos temporales de

las mIPSCs tratados con SKF 38393. (a, fue el registro durante la condición control; b durante la acción del agonista y c es una sobreposición de a y b). B. Distribuciones de probabilidad acumulada para el intervalo inter-evento (gráfica superior) y la amplitud de la corriente (gráfica inferior) de las mIPSCs GABAérgicas mostrados en (A). C. La gráfica de puntos (n=8) muestra los resultados de la medición de la frecuencia (superior) y la amplitud (inferior) de las mIPSCs

La figura 14A-C muestra que la perfusión por si solo del agonista selectivo de los receptores D3 el PD 128,907 (100 nM) no tiene efectos significativos sobre el intervalo inter-evento (Control: 1.62 ± 0.24 Hz; PD 128,907: 1.52 ± 0.18 Hz, n.s., $F= 29.68$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=8), mientras que la perfusión del agonista de los receptores D1 el SKF 38393(3 μ M) por si solo en las mismas células significativamente aumenta la frecuencia de las mIPSCs (2.48 ± 0.30 Hz, $p<0.001$ comparada contra el control, n=8). La media de las amplitudes fueron las siguientes: 60.72 ± 4.07 pA en el control, 59.66 ± 3.52 pA con el PD 128,907 y 58.82 ± 3.78 pA con SKF 38393, no mostrando diferencias significativas. Debido a que la ausencia de efectos significativos sobre la amplitud de las mIPSCs fueron uniformes a través de los experimentos, la descripción de los efectos sobre la amplitud será omitida, sin embargo, serán mostrados en las figuras. La figura 14A muestra el trazo representativo de un experimento en la condición control, adición del PD 128,907 y SKF 38393, la sobreposición de las corrientes obtenidas en cada condición experimental muestra que las cinéticas de las mIPSCs en la presencia y ausencia del agonista no fue alterada.

Debido a previas evidencias (Schwartz et al., 1998; Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008) que sugerían que la estimulación de los receptores D3 es efectiva cuando son coactivados al mismo tiempo con receptores D1, se analizaron los efectos de la adición del agonista selectivo de los receptores D3 PD 128,907 (100 nM) y el SKF 38393 contenido en el fluido de perfusión (Figuras 15D-F y 16A-C). En los experimentos de la figura 15D-F la adición de SKF 38393 aumentó la frecuencia de 1.64 ± 0.15 Hz a 2.35 ± 0.20 Hz ($p<0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=11). Cuando posteriormente PD 128,907 fue administrado junto con SKF 38393, la frecuencia aumentó a 3.14 ± 0.24 Hz ($p<0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=11). La tabla 2 muestra que el

58% de las células fueron más estimuladas (33/57) cuando PD 128,907 se adicionó al fluido que contenía SKF 38393.

Finalmente, cuando el antagonista selectivo de los receptores D1 SCH 23390 (100 nM) fue también incluido en el fluido de perfusión, el incremento en la frecuencia fue revertido a un valor que no fue significativamente diferente al control (1.57 ± 0.14 Hz vs 1.64 ± 0.15 Hz, n.s., ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=11). En otros experimentos la administración solo del SCH 23390 no afectó significativamente la amplitud y el intervalo inter-evento (la amplitud media en la condición control 66.93 ± 5.63 pA, SCH 23390 65.29 ± 6.28 pA, n.s., "t student", n=5; frecuencia media en la condición control 1.85 ± 0.12 Hz, SCH 23390 1.86 ± 0.18 Hz, n.s., "t student", n=5)

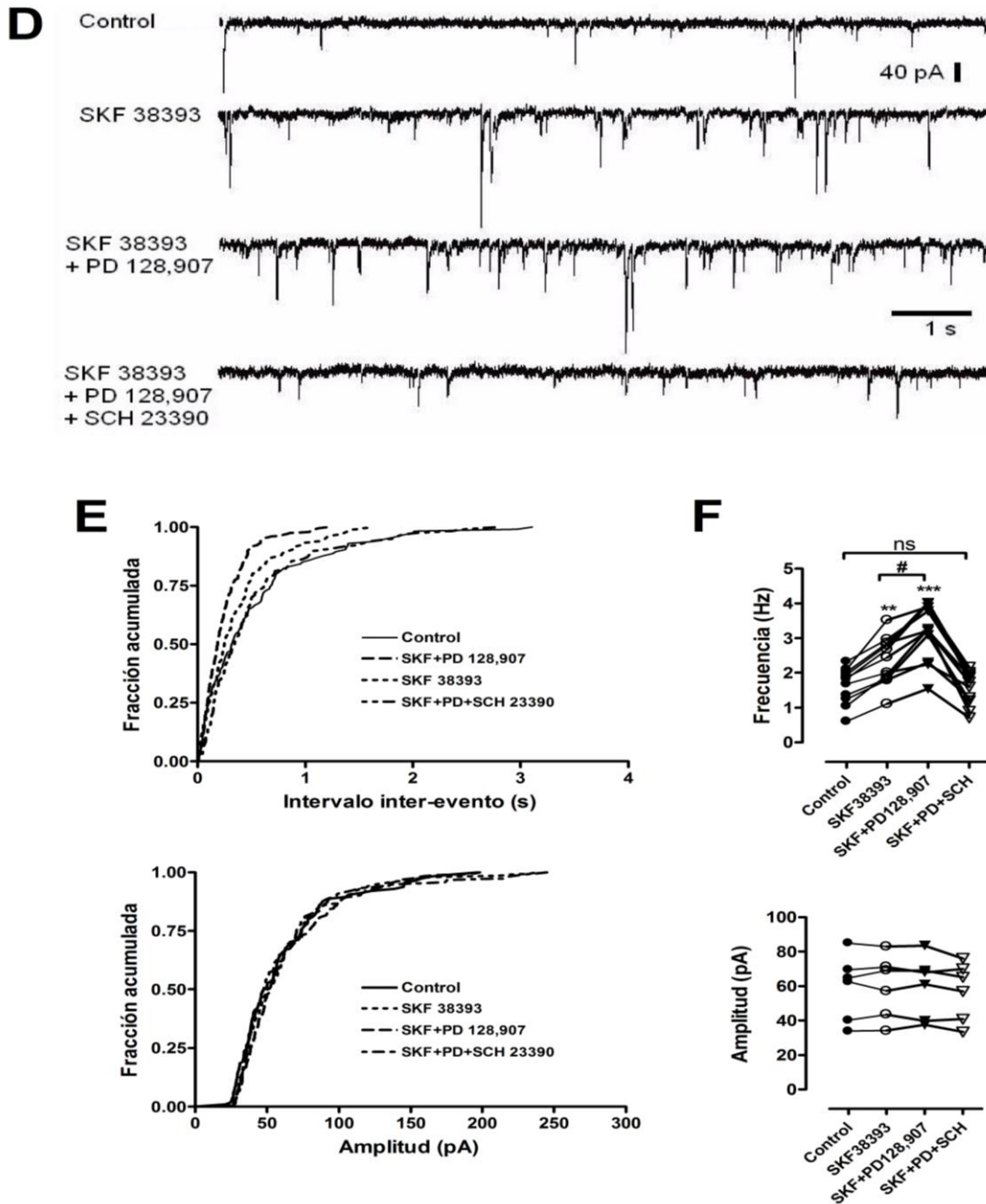


Figura 15: El agonista selectivo PD 128,907 aumenta la liberación espontánea de GABA cuando los receptores D1 fueron coactivados simultáneamente con SKF 38393. D. Muestra los trazos representativos registrados al mismo tiempo durante las condiciones control y después la aplicación de SKF 38393 solo, SKF 38393 y PD 128,907 juntos y finalmente cuando el antagonista selectivo de los receptores D1 SCH 23390 fue perfundido junto con los dos agonistas. E. Distribuciones de probabilidad acumulada para el intervalo inter-evento (gráfica superior) y la amplitud de la corriente (gráfica inferior) de las mIPSCs GABAérgicas mostrados en (E). F. La gráfica de puntos resume los resultados (n=11) de las mediciones de la frecuencia (arriba) y amplitud (abajo) de las mIPSCs. ***p<0.001, con respecto al control; #p<0.01, con respecto al SKF 38393 solo; n.s, diferencia no significativa.

La figura 16A-C muestra los efectos del antagonista selectivo de los receptores D3 GR 103691 sobre los efectos combinados del SKF 38393 y PD 128,907. Otra vez el SKF 38393 desplazó la distribución del intervalo inter-evento hacia la izquierda (Control: 1.53 ± 0.10 Hz; SKF 38393: 2.29 ± 0.14 Hz, $p < 0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, $n=11$). Posteriormente, la coactivación con PD 128,907 y SKF 38393 desplazó aún más la distribución acumulada del intervalo inter-evento (SKF 38393: 2.29 ± 0.14 Hz; SKF 38393 + PD 128,907: 2.93 ± 0.21 Hz, $p < 0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, $n=11$). Cuando el bloqueador selectivo de los receptores D3 GR 103691 (50 nM) fue también incluido en la solución de perfusión los efectos combinados del PD 128,907 y SKF 38393 fueron reducidos a un nivel (2.27 ± 0.14 Hz) que no fue diferentemente significativo de lo que se observó cuando el SKF 38393 fue administrado solo (n.s., ANOVA seguido de la prueba de Tukey, $n=11$).

TABLA 2

El número de neuronas que mostraron algún cambio en la frecuencia de las mIPSCs durante el tratamiento con los agonistas

	Tratamiento	Efecto	No efecto	Total	%
1.	D1 (SKF 38393)	82	16	98	83
2.	D3 (PD 128,907)	0	21	21	0
3.	D1 + D3	33	24	57	58
4.	D4 (PD 168,077)	27	9	36	75
5.	D3 + D4	0	8	8	0

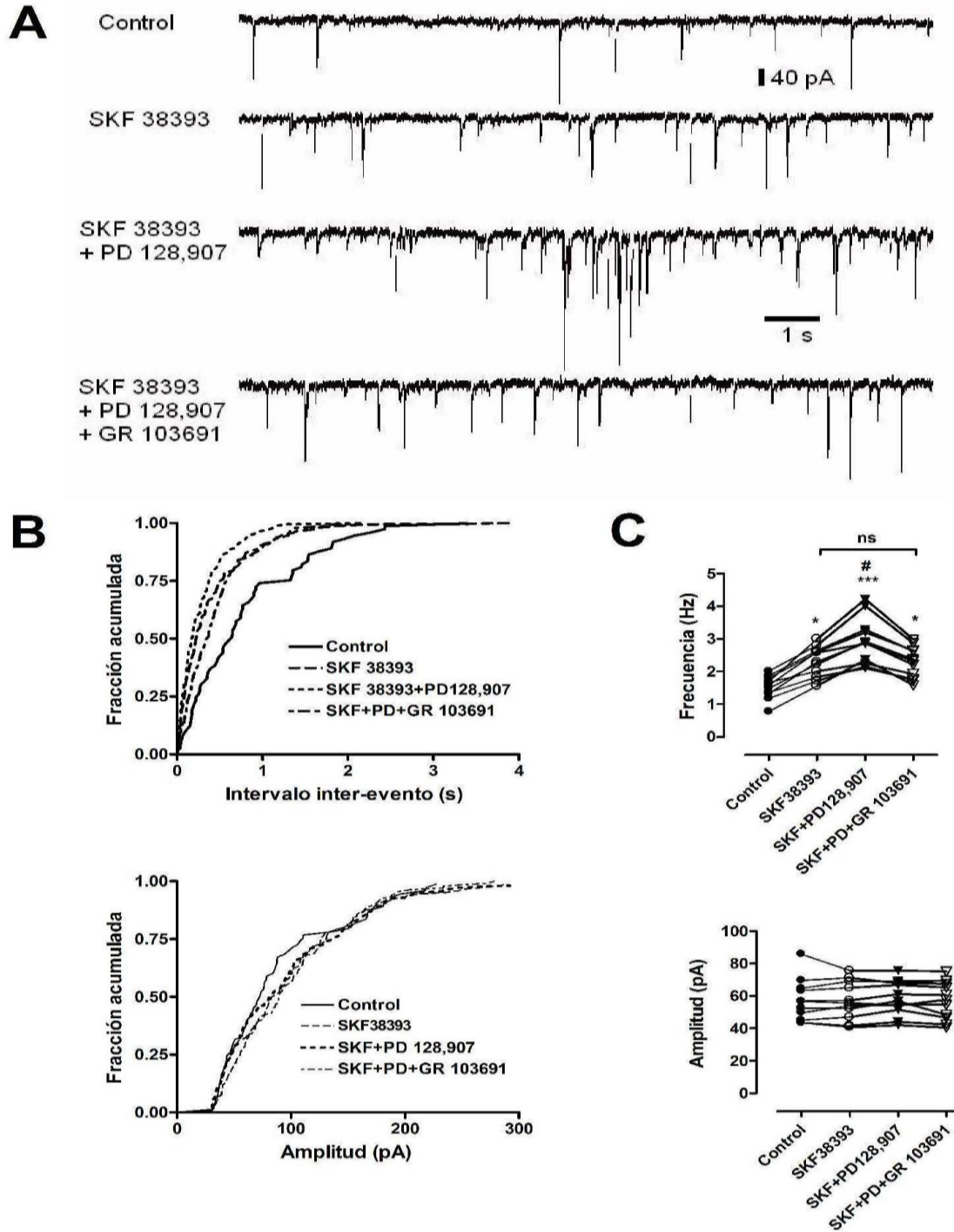


Figura 16: Los efectos del agonista de los receptores D3 PD 128,907 sobre la liberación espontánea de GABA son inhibidos por el antagonista selectivo de los receptores D3 GR 103691. A, B y C. El PD 128,907 aumenta la liberación espontánea de GABA cuando los receptores D1 fueron estimulados simultáneamente con SKF 38393. A. Muestra los trazos representativos primero durante las condiciones control y después la aplicación de SKF 38393 solo, posteriormente la adición de SKF 38393 y PD 128,907 y finalmente los dos agonistas mas el antagonista de los receptores D3 GR 103691. B. Distribuciones de la probabilidad acumulada para el intervalo inter-evento (superior izquierdo) y la amplitud de las corrientes (inferior izquierdo) de las mIPSCs mostrados en A. C. La gráfica de puntos resume (n=8) los resultados de la frecuencia (arriba) y amplitud (abajo) de las mediciones de las mIPSCs.

La figura 17D-F muestra que el efecto potenciador del PD 128,907 fue revertido con la solución de perfusión que contenía solamente SKF 38393 por aproximadamente 15 min (Control 1.63 ± 0.15 Hz; SKF 38393 + PD 128,907 3.25 ± 0.27 ; SKF 38393 2.47 ± 0.22 ; n=11).

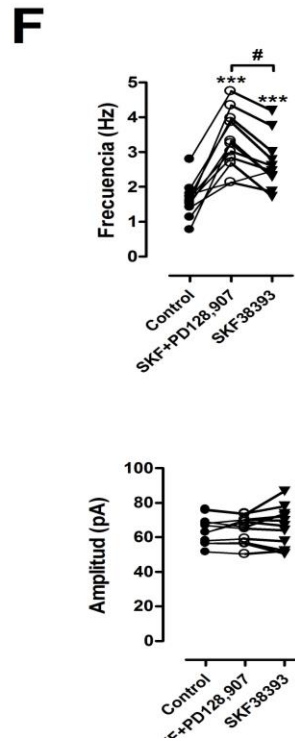
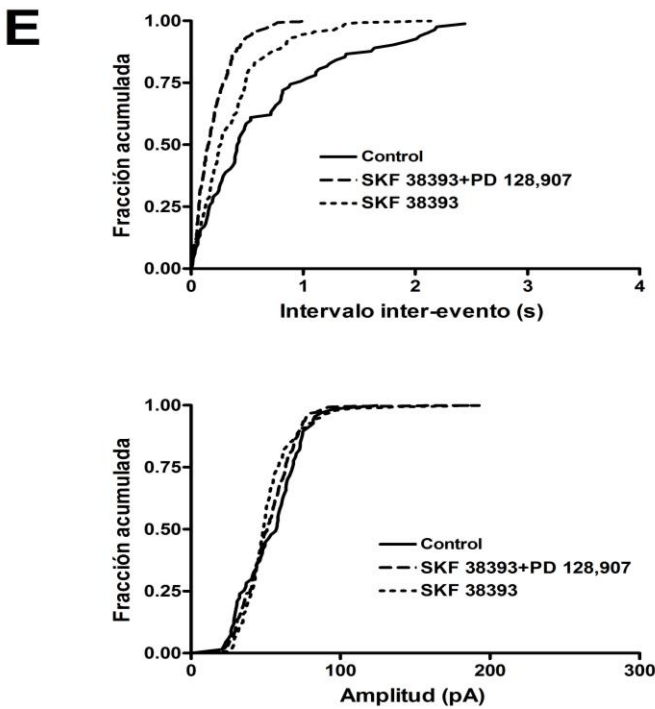
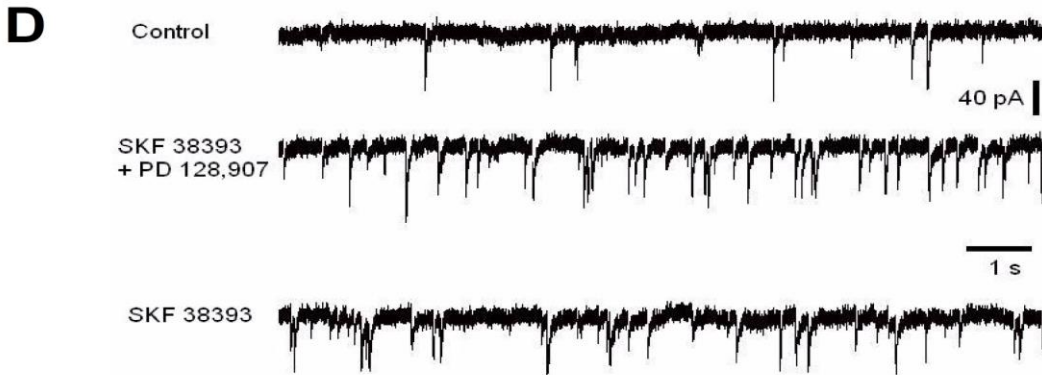


Figura 17: Los efectos del agonista de los receptores D3 PD 128,907 sobre la liberación espontánea de GABA son reversibles. D. El trazo superior fue registrado durante el periodo control. El siguiente trazo fue registrado durante la aplicación de 100 nM PD 128,907 junto con el SKF 38393 (3 μ M). El trazo inferior fue perfundido con una solución que contenía solamente SKF 38393. E. Distribuciones de la probabilidad

acumulada para el intervalo inter-evento (superior izquierdo) y la amplitud de la corriente (inferior izquierdo) de las mIPSCs mostrados en D. F. La gráfica de puntos resume (n=8) los resultados de la frecuencia (arriba) y la amplitud (abajo) de las mIPSCs. ***p<0.001 con respecto al control; #p<0.01 con respecto a SKF 38393; n.s. diferencia no significativa.

LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES D4 DISMINUYE LA LIBERACIÓN DE GABA DE LAS TERMINALES PÁLIDO-NIGRALES

La administración por sí solo del antagonista selectivo de los receptores D4 el L 745,870 (100 nM) no modifica ni el intervalo inter-evento ni la amplitud de las mIPSCs (amplitud media del control: 51.31 ± 7.48 pA; +L 745,870: 50.69 ± 7.46 pA, n.s., "t student"; frecuencia medial del control: 1.43 ± 0.27 Hz; +L 745,870: 1.51 ± 0.37 Hz, n.s., "t student", n=6).

En otros experimentos el agonista selectivo de los receptores D4 PD 168,077 (100 nM) (Fig. 18) fue adicionado junto con el antagonista de los receptores D4 y ningún efecto fue observado (Control: 2.00 ± 0.31 Hz; PD 168,077 + L 745,870: 1.92 ± 0.30 Hz, n.s., n=8). Sin embargo, después del retiro del L 745,870 dejando solo el PD 168,077 en la perfusión, el intervalo inter-evento de las mIPSCs fue reducido de 1.92 ± 0.31 a 1.38 ± 0.22 Hz (p<0.001, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=8). Cuando la rebanada fue después lavada con una solución que no contenía ningún ligando de los receptores la frecuencia aumentó a 1.90 ± 0.31 Hz (no diferentemente significativo del control: 2.00 ± 0.31 Hz, ANOVA seguido de la prueba de la Tukey, n=8).

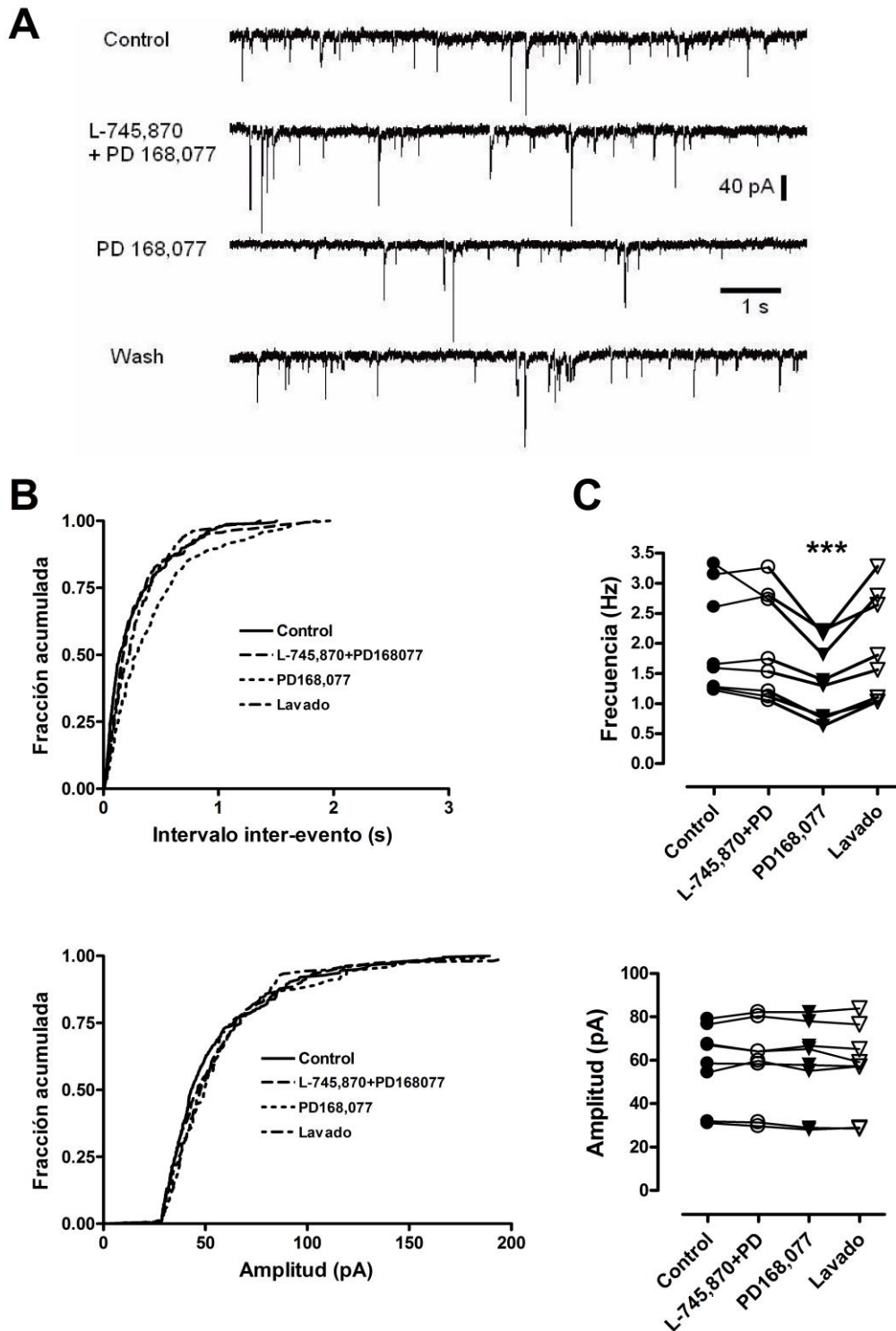


Figura 18: el antagonista selectivo de los receptores D4 L 745,870 bloquea la inhibición de la liberación espontánea de GABA producida por el agonista selectivo de los receptores D4 PD 168,077. A. trazos representativos de las mIPSCs. El trazo superior fue registrado antes de la aplicación de los ligandos. Después, sucesivamente desde el trazo superior al inferior, la solución de perfusión contenía L 745,870 + PD 168,077, después el PD 168,077 solo y finalmente la solución de lavado. B. Distribuciones de probabilidad acumulada para el intervalo inter-evento (arriba) y la amplitud de la corriente (inferior) de las mIPSCs

GABAérgicas mostradas en (A). La gráfica de puntos resume (n=8) los resultados de la frecuencia (arriba) y amplitud (abajo) de las mediciones de las mIPSCs. ***p<0.001 con respecto al control.

LA LESIÓN DE LAS NEURONAS DEL GLOBO PÁLIDO ELIMINA LA INHIBICIÓN PRODUCIDA POR LOS RECEPTORES D4.

Para determinar que aferencias GABAérgicas tenían presente los receptores D4, las neuronas del Globo Pálido fueron lesionadas al inyectar ácido kaínico en el interior del núcleo. Anteriormente ya se había mostrado que la inyección de ácido kaínico redujo la población neuronal del Globo Pálido cerca del 80% (Ver Acosta-Garcia et al., 2009; Gasca-Martinez et al., 2010). Cuando los efectos de la activación de los receptores D4 con el agonista selectivo de los receptores D4 sobre la frecuencia de las mIPSCs fueron comparados en la SNr del lado intacto y lesionado del mismo cerebro, la lesión previno el efecto del agonista D4. En el lado no lesionado: control, 2.42 ± 0.36 Hz; PD 168,077, 1.79 ± 0.30 (P<0.001, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=10; Lavado, 2.35 ± 0.33 n.s., con respecto al control). En el lado lesionado, control, 2.17 ± 0.33 Hz; PD 168,077, 2.13 ± 0.36 (n.s., no significativo, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=9). Estos resultados confirman que los receptores D4 responsables de la inhibición de la transmisión GABAérgica en la SNr están principalmente localizados en las terminales palidales.

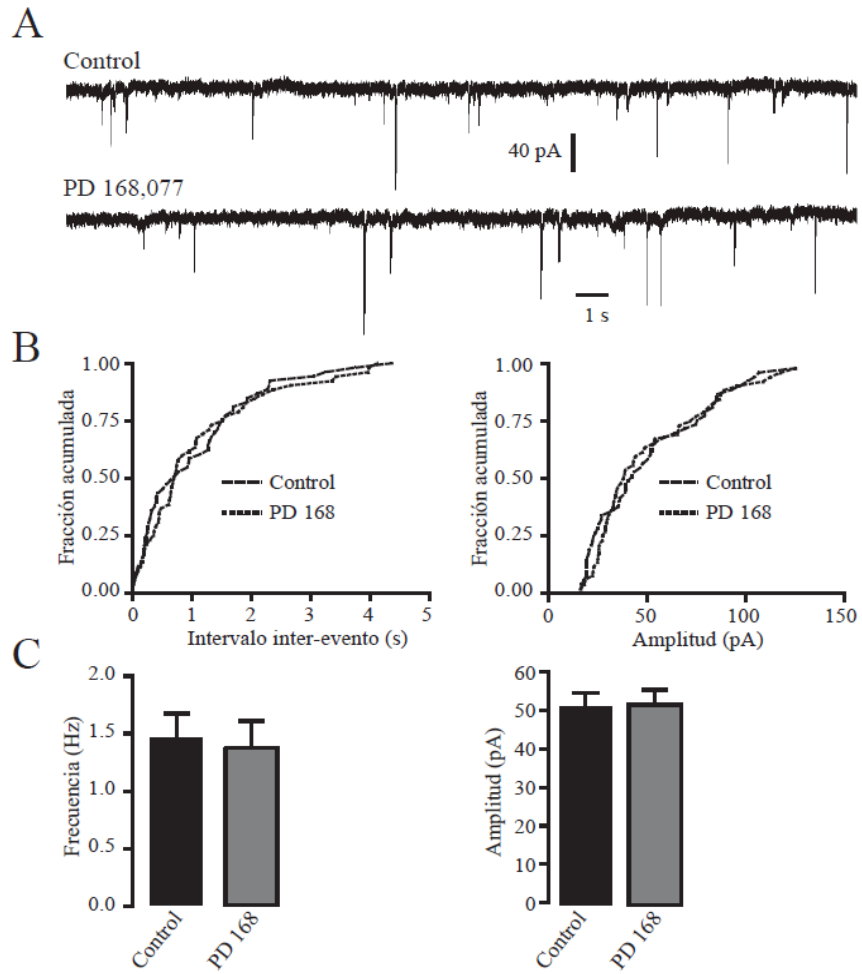


Figura 19: La lesión de las neuronas del GP elimina el efecto inhibitor de los receptores D4 en la SNr.

LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES D3 NO MODIFICAN LAS mIPSCs EN LAS SINAPSIS QUE SON INHIBIDAS POR LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES D4.

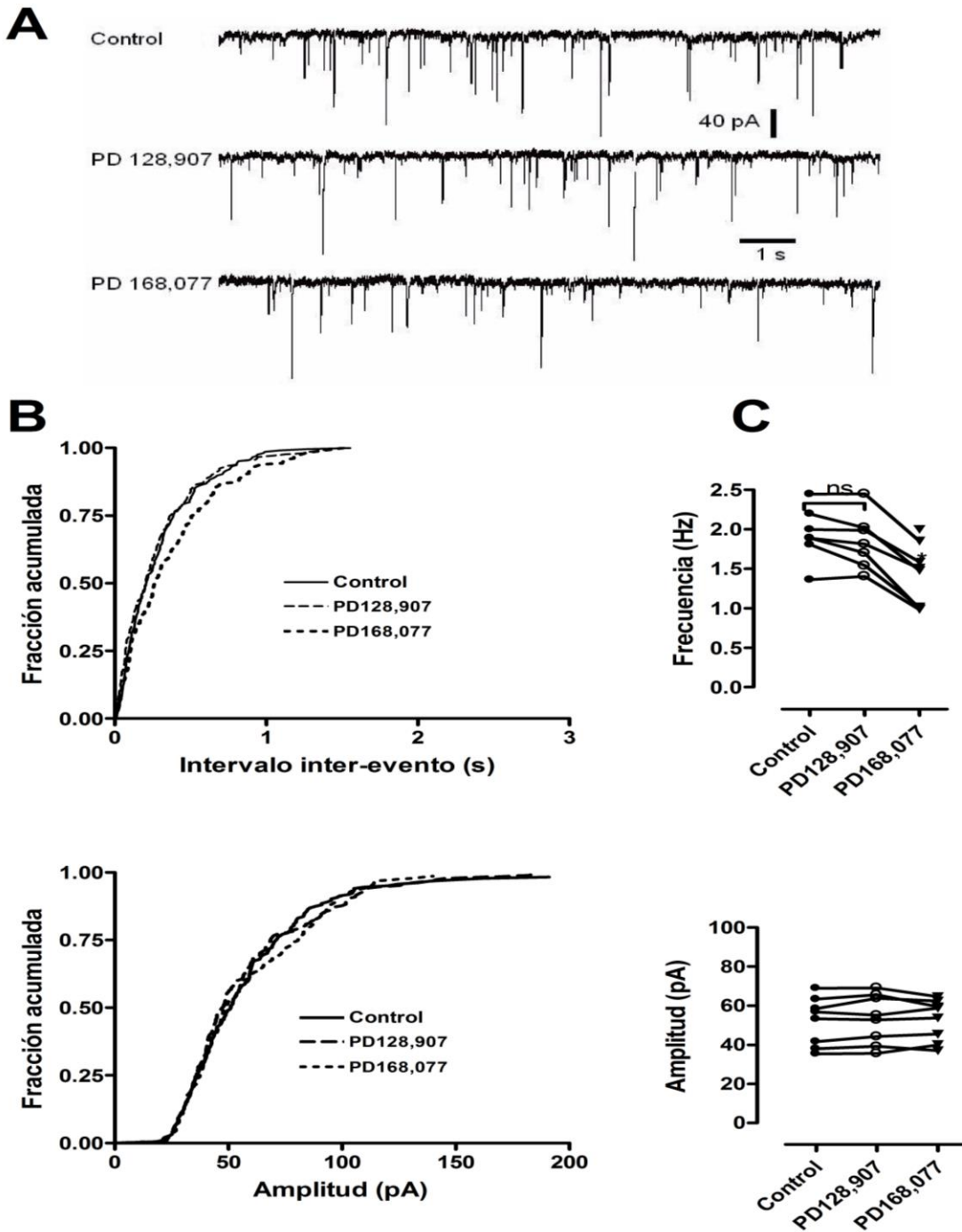


Figura 20: el agonista de los receptores D3 PD 128,907 por si solo no modifica la liberación espontánea GABA, mientras que el agonista selectivo de los receptores D4 PD 168,077 por si solo inhibió la liberación

espontánea de GABA. A. Trazos representativos durante la condición control (arriba), y las aplicaciones separadas de PD 128,907 (en medio) y el PD 168,077 (abajo). B. Distribuciones de probabilidad acumulada para el intervalo inter-evento (arriba) y la amplitud de las corrientes (abajo) de las mIPSCs GABAérgicas mostrados en (A). C. La gráfica de puntos resume (n=8) los resultados de la frecuencia (arriba) y amplitud (abajo) de las mediciones de las mIPSCs. *p<0.01 con respecto al control.

Debido a que no se encontró ningún efecto inhibitor del agonista de los receptores PD 128,907 administrado por sí solo, se examinó también sus efectos en células que mostraron una respuesta inhibitor hacia el agonista de los receptores D4 PD 168,077. Se analizaron los efectos cuando ambos agonistas fueron administrados por separado. (Figura 20A-C) o juntos (Figura 21D-F). Como previamente se describió el PD 128,907 por si solo significativamente no inhibió la frecuencia de las mIPSCs (Control: 2.06 ± 0.16 Hz; PD 128,907: 1.96 ± 0.16 Hz); sin embargo, el PD 168,077 por si solo tuvo un significativo efecto inhibitor (1.42 ± 0.13 Hz, $p<0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=8). Cuando el PD 168,077 y PD 128,907 fueron administrados al mismo tiempo (Figura 21D-F), la frecuencia fue reducida significativamente desde 1.82 ± 0.30 Hz hasta 1.27 ± 0.22 Hz ($p<0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=8). Posteriormente cuando el PD 168,077 estuvo solo en la solución de perfusión la frecuencia permaneció casi en el mismo valor de inhibición 1.24 ± 0.23 Hz. Este valor fue significativamente más bajo que el control ($p<0.001$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey, n=8). El PD 168,077 tuvo un efecto inhibitor en el 75% de las células registradas (Tabla 2) comparada con la ausencia de efectos de PD 128,907 administrado por si solo (0/21, 0%).

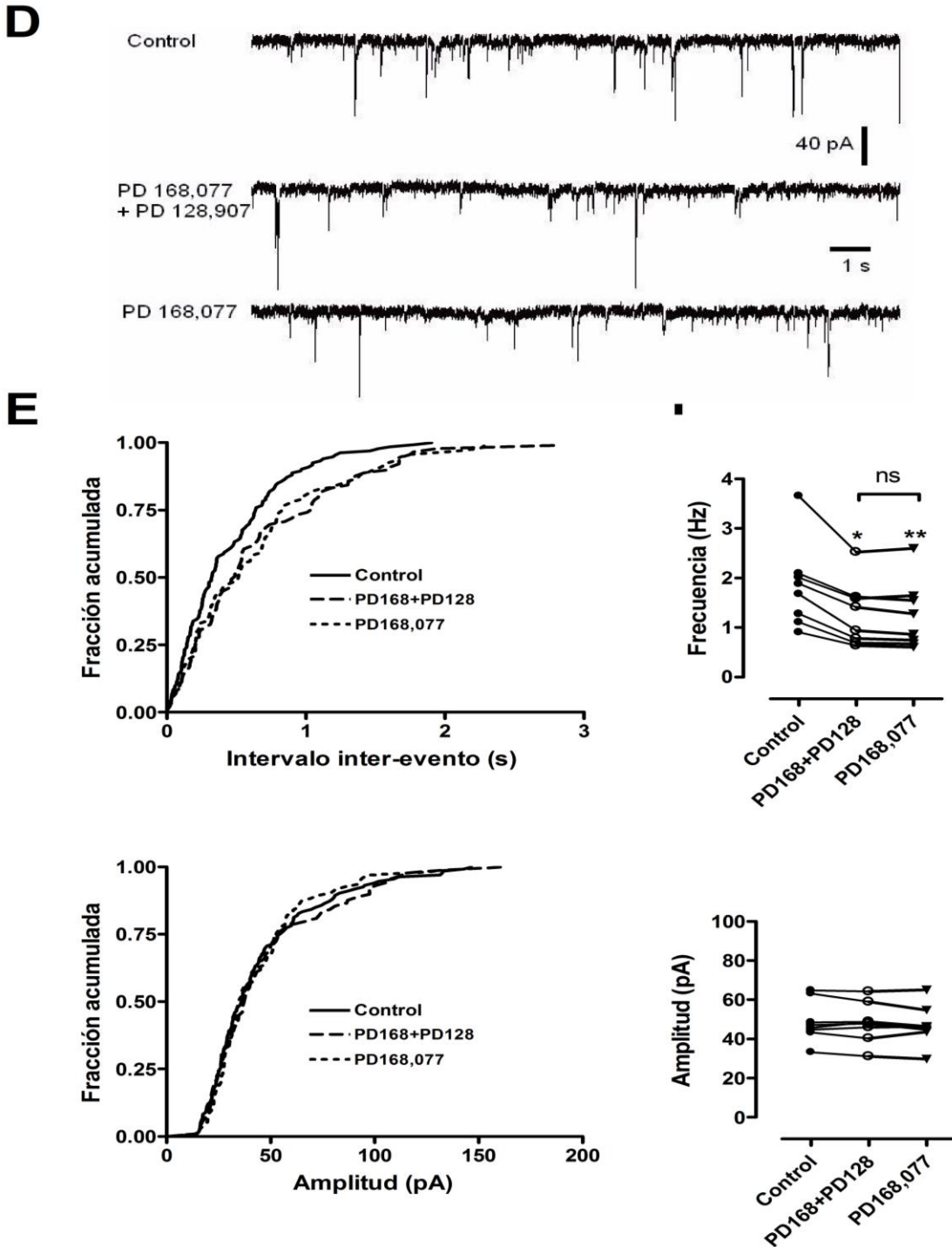


Figura 21: el agonista selectivo de los receptores D3 PD 128,907 no modificó la liberación espontánea de GABA en neuronas que responden al agonista selectivo de los receptores D4 PD 168,077. D. Trazos representativos durante el periodo control (arriba), y las aplicaciones de PD 128,907 junto con el PD 168,077 (en medio) y PD 168,077 solo (abajo). E. Distribuciones de la probabilidad acumulada para el intervalo inter-evento (arriba) y la amplitud (abajo) de las corrientes mIPSCs GABAérgicas que se muestran en (D). F. La gráfica de puntos resume (n=8) los resultados de la frecuencia (arriba) y la amplitud (abajo) de las mediciones de las mIPSCs. **p<0.001, con respecto al control, n.s., no significativo.

11.DISCUSIÓN

El más interesante hallazgo de este proyecto es que la estimulación de los receptores D3 en las neuronas espinosas medianas que proyectan a la SNr aumentan aún más la liberación de GABA producida por la estimulación de los receptores D1. Además, no se encontró una acción inhibitoria al estimular los receptores D3 sobre la liberación de GABA en las terminales donde la estimulación de los receptores D4 inhibe la liberación de GABA.

LOS RECEPTORES D1 Y D3 ESTÁN LOCALIZADOS EN LAS TERMINALES ESTRIADO-NIGRALES

La observación de que la activación de los receptores D1 aumentan la frecuencia de las mIPSCs GABAérgicas sin cambiar la amplitud indica que el efecto es producido al aumentar la liberación del neurotransmisor y no por un efecto sobre la membrana postsináptica. El hallazgo de que los receptores D1 y D3 están colocados en los sinaptosomas de la SNr (Ávalos et al., 2013) junto con el hallazgo de que la activación de los receptores D3 estimula la liberación de GABA y la producción de AMPc solamente cuando se coactivan junto con los receptores D1, fuertemente implica que ambos receptores están localizados en la misma población de las terminales.

Estas terminales son, casi seguramente, las proyecciones de las neuronas espinosas medianas porque los tipos de receptores dopaminérgicos en las terminales GABAérgicas hacia la SNr están anatómicamente segregados: los receptores D1 están localizados en las proyecciones estriado-nigrales, mientras que los receptores D4 están situados en las terminales pálido-nigrales (Acosta-Garcia et al., 2009). Evidencias electrofisiológicas están de acuerdo con esta conclusión (Aceves et al., 2011).

Otra evidencia está también de acuerdo con esta suposición, determinaciones de ARNm muestran que el mensajero de los receptores D1 y D3 están selectivamente coexpresados en las neuronas espinosas medianas positivas de sustancia P (Surmeier et al., 1996). También, la proteína del receptor D3 se ha encontrado en la SNr, pero no su ARNm, lo que sugiere además un origen externo de los receptores D3 nigrales (Diaz et al., 1995). Así con los resultados obtenidos durante este proyecto junto con otros hallazgos en la

literatura muestran que la colocalización de los receptores D1 y D3 en las neuronas estriado-nigrales tienen un papel bien definido que aún no habían sido identificado (Gerfen y Surmeier, 2011).

PAPEL DE LA DOPAMINA ENDÓGENA SOBRE LOS EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES D1 Y D4 EN LAS mIPSCs Y LAS IPSCs EVOCADAS.

En los resultados obtenidos con el antagonista de los receptores D1 SCH 23390 ó el antagonista de los receptores D4 L 745,870 no se obtuvieron efectos sobre las mIPSCs a menos que estos fueran administrados junto con los agonistas correspondientes. En contraste, Aceves et al. (2011) mostró que los antagonistas de los receptores D1 y D4 modificaron las eIPSCs en la ausencia de la adición de los agonistas. Diferencias en la acción de los antagonistas dopaminérgicos sobre las mIPSCs y eIPSCs no están sin precedentes (Radnikow y Misgeld, 1998).

La liberación de GABA en la SNr está modulada por la liberación dopamina de las dendritas de la SNc (Aceves et al., 1995). Bajo ciertas condiciones experimentales, la liberación de dopamina endógena puede estar lo suficientemente elevada para modular la transmisión sináptica. Algunos trabajos realizados en rebanadas que contienen la SNr, Radnikow y Misgeld (1998) demostraron que los antagonistas de los receptores D1 por sí solos deprimen las eIPSCs pero no afectan las mIPSCs. Ellos propusieron que cuando las eIPSCs son inducidas, la dopamina en el espacio sináptico alcanza un nivel suficiente para modular la liberación de GABA de las terminales estriado-nigrales y mientras que cuando el disparo de potenciales de acción es bloqueado, los niveles de dopamina son tan bajos que no afectan las mIPSCs. Un papel parecido de dopamina endógena había sido sugerido en la modulación de la liberación de glutamato en la SNr. Ibañez-Sandoval et al. (2006) encontró que las eEPSCs en la SNr son modificadas por los antagonistas D1 y D2 en la ausencia de los agonistas añadidos y concluyeron que bajo sus condiciones experimentales la dopamina endógena modula la liberación de GABA.

De acuerdo con la conclusión de Radnikow y Misgeld (1998), sugerimos que los diferentes efectos sobre las mIPSCs (nuestros resultados), y las eIPSCs (Aceves et al., 2011) de los antagonistas de los receptores D1 y D4 son debido a los diferentes niveles de dopamina en el espacio sináptico.

RECEPTORES D4 EN LAS PROYECCIONES PÁLIDO-NIGRALES. AUSENCIA DE LOS EFECTOS INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES D3.

En los experimentos realizados encontramos que el agonista selectivo de los receptores D4 PD 168,077 consistentemente reducen la frecuencia de las mIPSCs sin afectar su amplitud; este efecto fue bloqueado por el antagonista selectivo de los receptores D4 L 745,870 (Figura 18). En anteriores experimentos (Acosta-Garcia et al., 2009), la lesión del GP eliminó las respuestas producidas por la activación de los receptores D4. Estos resultados obtenidos están de acuerdo con la conclusión de Acosta-Garcia et al. (2009) quién identificó las terminales que respondían a los receptores D4 como proyecciones pálido-nigrales. Conclusiones parecidas fueron también hechas por Aceves et al., (2011).

En contraste con los consistentes efectos inhibidores de los agonistas de los receptores D4 (Figuras 20 y 21) no se encontró ningún efecto inhibitor del agonista de los receptores D3 PD 128,907 sobre las mIPSCs, aún en células que respondieron al agonista de los receptores D4 PD 168,077 (Figura 21).

Al contrario, Aceves et al. (2011) propuso que la activación de los receptores D3 inhibe la liberación de GABA de las terminales pálido-nigrales. Ellos basan sus conclusiones sobre dos de sus hallazgos: el agonista quinelarone disminuyó la amplitud de las eIPSCs mientras que el antagonista U-9914A producido por la estimulación de la proyección pálido-nigral. La literatura para quinelarone (Newman-Tancredi et al., 1997; Coldwell et al., 1999; Newman-Tancredi et al., 2002) indican que la concentración (500 nM) usada por Aceves et al. (2011) activa no solo receptores D3 sino también a los receptores D2 y D4. El antagonista U-9914A es más selectivo (Waters et al., 1993).

Además, otros estudios no han encontrado que las neuronas palidales sean moduladas por receptores D3. Shin et al. (2003) y Hernandez et al. (2006) encontraron que las propiedades electrofisiológicas de estas células están moduladas por receptores D4 pero no por receptores D2/D3. Determinaciones de la liberación de [³H] GABA en rebanadas que contiene la SNr tampoco encontraron un efecto inhibitor de la estimulación de los receptores D3 sobre la liberación de GABA en la SNr (Avalos et al., 2010). La evidencia de

los estudios moleculares apunta en la misma dirección ya que la expresión de receptores D3 en las estructuras palidales es ya sea débil o inexistente. (Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991; Levesque et al., 1992; Levant, 1998; Ridray et al., 1998).

Como se discutió anteriormente, los efectos de los antagonistas de dopamina administrados sin la presencia de agonistas implica liberación significativa de dopamina endógena. Una posibilidad es que U 99194A puede antagonizar los efectos de dopamina endógena de los receptores D3 localizados afuera de las terminales pálido-nigrales en sí mismas. Un sitio para tales receptores podrían ser las proyecciones GABAérgicas que el sistema límbico envía a la SNr (Dray y Oakley, 1997; Walass y Fonnum, 1980; Strahlendorf y Barnes, 1983). Los receptores están expresados en alta densidad en el sistema límbico donde ellos inhiben la cascada de la PKA (Schwartz et al., 1998), así, es posible que el estímulo eléctrico en las rebanadas cerebrales usadas por Aceves et al. (2011) pueda ser eficaz en activar tal población de fibras. Evidentemente, la elucidación de los mecanismos de acción de U 99149A sobre las corrientes IPSCs evocadas por estimulación eléctrica tienen que ser aún resueltas por experimentos adicionales

12. CONCLUSIONES

1. La activación de receptores D3 presinápticos potencia la liberación de GABA estimulada por la activación de receptores D1 en las terminales estriado-nigrales de la sustancia negra parte reticulada
2. La activación de receptores D3 no modifica la inhibición de la liberación de GABA estimulada por la activación de receptores D4 en las terminales pálido-nigrales de la sustancia negra parte reticulada

13.BIBLIOGRAFÍA

Aceves, J., Floran, B., Sierra, A., Mariscal, S. (1995) "D-1 receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat". *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 19, 727-39.

Aceves, J.J., Rueda.Orozco, P.E., Hernández, R., Plata, V., Ibañez-Sandoval, O., Galarraga, E., Bargas, J. (2011) "Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons". *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 1-10.

Acosta-García, J., Hernández-Chan, N., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Erlij, D., Aceves, J., Floran, B. (2009) "D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat". *Neuropharmacology*, 57, 725-30.

Alexander, G.E., DeLong, M.R., Strick, P.L. (1986) "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex". *Annual Review of Neuroscience*, 9, 357-381.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D., DeLong, M.R. (1990) "Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions". *Progress Brain Research*, 85, 119-146.

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

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

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

Avalos, A., Rangel, C., Silva, I., Cruz, R., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B.G. (2010) "Intracellular Ca²⁺ regulates dopamine D3 receptor effects on GABA release by

striatonigral terminals of the rat via activation of CAMKII". *Neuroscience. Abstract*, 741.12

Avalos-Fuentes, A., Loya-López, S., Flores-Perez, A., Recillas-Mancillas, S., Cortés, H., Paz-Bermudez, F., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B. (2013) "Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner". *Neuropharmacology*, 71, 273-81.

Berger, M.A., Defagot, M.C., Villar, M.J., Antonelli, M.C. (2001) "Dopamine and metabotropic glutamate receptors in cerebral cortex and striatum in rat brain". *Neurochemistry Research*. 26: 345-352.

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

Bevan, M.D., Smith, A.D., Bolam, J.P. (1996) "The substantia nigra as a site of synaptic integration of functionally diverse information arising from the ventral pallidum and the globus Pallidus in the rat". *Neuroscience*, 75, 5-12.

Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D. (2000) "Synaptic organization of the basal ganglia". *Journal of Anatomy*. 196:527-542.

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

Bormann, J., Hamill, O.P., Sakmann, B. (1987). "Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons". *Journal of Physiology*. 385, 243-286.

Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B., Schwartz, J.C. (1991) "Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA". *Brain Research*, 564, 203-219.

Cebrián, C., Parent, A., Prensa, L. (2007). "The somatodendritic domain of substantia nigra pars reticulata projection neurons in the rat". *Neuroscience Research*. 57, 50-60.

Celada, P., Paladini C.A., Tepper, J.M. (1999) "GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata". *Neuroscience*, 3, 813-25.

Chevalier, G., Vacher, S., Deniau, J.M., Desban, M. (1985) "Disinhibition as a basic process in the expression of striatal function. I. The striato-nigral influence on tecto-spinal/tecto-diencephalic neurons". *Brain Research*, 334, 215-226.

Chuhma, N., Tanaka, K.F., Hen, R., Rayport, S. (2011) "Functional connectome of the striatal medium-spiny neuron" *Journal of Neuroscience*, 31, 1183-1192.

Coldwell, M.C., Boyfield, I., Brown, A.M., Stemp, G., Middlemiss, D.N. (1999) "Pharmacological characterization of extracellular acidification rate responses in human D2 (long), D3 and D4.4 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells". *British Journal of Pharmacology*, 127, 1135-1144.

Connelly, W.M., Schulz, J.M., Lees, G., Reynolds J.N. (2010) "Differential short-term plasticity at convergent inhibitory synapses to the substantia nigra pars reticulata" *Journal of Neurosciences*, 44, 14854-61

Cooper, A.J. and Stanford, I.M. (2001) "Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABAA IPSCs in vitro". *Neuropharmacology*. 41: 62-71.

Crossman, A.R. (1990) "A hypothesis on the pathophysiological mechanisms that underlie levodopa- or dopamine agonist-induced dyskinesia in Parkinson's disease: implications for future strategies in treatment". *Movement Disorders*, 2, 100-8.

Cruz-Trujillo, R., Sierra, A., Valdiosera, R., Erlij, D., Floran, B., Aceves, J. (2008) "Dopamine modulates via D4 receptors pallido-nigral transmission to substantia nigra". *Neuroscience, Abstract*, 274.15

Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Bates, M., Caron, M.G. (1990). "Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor". *Nature*. 347, 72-76.

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

Dray A. and Oakley, N.R. (1977) "Projections from nucleus accumbens to globus pallidus and substantia nigra in the rat". *Experientia*, 34, 68-70.

Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S.R., Javitch, J.A., Lohse, M.J., Mackie, K., Milligan, G., Pflieger, K.D., Pin, J.P., Volkow, N.D., Waldhoer, M., Woods, A.S., Franco, R. (2009) "Building a new conceptual framework for receptor heteromers". *Nat Chem Biol*, 5, 131-134.

Florentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., Missale, C. (2008) "Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization". *Molecular Pharmacology*, 74, 59-69.

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

Floran, B., Aceves, J., Sierra, A., Martínez-Fong, D. (1990) "Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat". *Neurosciences Letter*, 116, 136-140.

Florán, B., Florán, L., Erlij, D., Aceves, J. (2004). "Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced [³H]GABA release in the rat subthalamic nucleus". *European Journal of Pharmacology*. 498, 97-102.

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

Freneau. R.J., Duncan, G.E., Fornaretto, M.G., Dearry, A., Gingrich, J.A., Breese, G.R., Caron, M.G. (1991). "Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective and neuroendocrine aspects of dopaminérgica neurotransmission. *PNAS*. 91, 12564-12568.

Fujiyama, F., Stephenson, F.A., Bolam, J.P. (2002) "Synaptic localization of GABA(A) receptor subunits in the substantia nigra of the rat: effects of quinolinic acid lesions of the striatum". *European Journal of Neurosciences*, 12, 1961-75.

Galvan, A., Kuwajima, M., Smith, Y. (2006). "Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function?". *Neuroscience*. 143, 351-375.

Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M.L., Sako, H., Green, S.A., Dascal, N., Scott, J.D., Hosey, M.M. (1997). "cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits". *Neuron*. 19. 185-196.

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

Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J.Jr., Sibley, D.R. (1990) "D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons". *Science*, 250, 1429-1431.

Gerfen, C.R and Surmeier, D.J. (2011) "Modulation of striatal projection systems by dopamine". *Annual Reviews of Neurosciences*, 34, 441-66.

Gerfen, C.R., Herkenham, M., Thibault, J. (1987) "The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems". *Journal of Neurosciences*. 7, 3915-3934.

Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., Agnati, L.F., Verniera, P., Lluís, C., Ferré, S., Fuxe, K., Franco, R. (2000) "Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes". *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 8606–8611.

Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.C., Sokoloff, P. (2011) "BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization". *Nature*, 411, 86–89.

Hasbi, A., O'Dowd, B.F., George, S.R. (2010) "Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms". *Curr Opin Pharmacol*, 10, 93–99.

Hernández, A., Ibañez-Sandoval, O., Sierra, A., Valdiosera, R., Tapia, D., Anaya, V., Galárraga, E., Bargas, J., Aceves, J. (2006). "Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors". *Journal of Neurophysiology*. 96, 2877-2888.

Hikosaka, O., Wurtz, R.H. (1983) "Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. Relation to visual and auditory responses to saccades". *Journal of Neurophysiology*. 49:1230-1253.

Hisosaka, O., Takikawa, Y., Kawagoe, R. (2000). "Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements" *Physiology Review*, 80, 953-978.

Hotte, M., Thuault, S., Lachaise, F., Dineley, K.T. (2006). "D1 receptor modulation of memory retrieval performance is associated with changes in pCREB and p-DARPP-32 in rat prefrontal cortex". *Behavioural Brain Research*. 171, 127-133.

Ibañez-Sandoval, O., Hernández, A., Florán, B., Galárraga, E., Tapia, D., Valdiosera, R., Erlj, D., Aceves, J., Bargas, J. (2006). "Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors". *Journal of Neurophysiology*. 95, 1800-1811.

Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A. (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels". *Physiological Reviews*. 82, 503-568.

Jovanovic, V., Guan, H.C., Van Tol, H.H. (1999). "Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D4.2 and D4.10 receptor variants". *Pharmacogenetics*, 9, 561-568.

Kazmi, M.A., Snyder, L.A., Cypess, A.M., Graber, S.G., Sakmar, T.P. (2000). "Selective reconstitution of human D4 dopamine receptor variants with G α subtypes". *Biochemistry*. 39, 3734-3744.

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

Kim, K.M., Gainetdinov, R.R., Laporte, S.A., Caron, M.G., Barak, L.S. (2005) "G protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D3 receptor signaling by modulating the stability of a receptor-filamin-betaarrestin complex. A case of autoreceptor regulation". *J Biol Chem*, 280, 12774–12780.

Kimura, M., Minamimoto, T., Matsumoto, N., Hori, Y. (2004) "Monitoring and switching of cortico-basal ganglia loop functions by the thalamo-striatal system". *Neuroscience Research*, 48, 355-360.

Kolasa, T., Matulenko, M.A., Hakeem, A.A., Patel, M., Mortell, K., Bhatia, P., Henry, R., Nakane, M., Hsieh, G.C., Terranova, M.A., Uchic, M.E., Miller, L.N., Chang, R., Donnelly-Roberts, D.L. (2006). "1-Aryl-3-(4-pyridine-2-ylpiperazin-1-yl)propan-1-one Oximes as potent dopamine D4 receptor agonists for the treatment of erectile dysfunction". *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 5093-5109.

Korf, J., Zielesman, M., and Westerink, B.H. (1976)."Dopamine release in substantia nigra". *Nature*, 260, 257-258.

Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Kay, K., Thwin M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C. (2010) "Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry" *Nature*, 466, 622-626.

Levan, B. (1998) "Differential distribution of D3 dopamine receptors in the brains of several mammalian species". *Brain Research*, 800, 269-274.

Levesque, D., Diaz, J., Pilon, C., Martres, M.P., Giros, B., Souil, E., Schott, D., Morgat, J.L., Schwartz, J.C., Sokoloff, P. (1992) "Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxyl-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8155-8159.

Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., Barnes, C., Goldberg, S.R., Lluís, C., Fuxe, K., Franco, R.(2008) "Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum". *J Biol Chem*, 283, 26016–26025

Mauger, C., Sivan, B., Brockhaus, M., Fuchs, S., Civelli, O., Monsma, F. (1998). "Development and characterization of antibodies directed against the mouse D4 dopamine receptor". *European Journal of Neuroscience*. 10, 529-537.

Middleton, F.A. and Strick, P.L. (2000) "Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits". *Brain Research Review*, 31, 236-250.

Milligan, G. (2008) "A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization". *British Journal of Pharmacology*, 153 (Suppl 1), 216–229.

Milligan, G. (2009) "G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function". *British Journal of Pharmacology*, 158, 5–14.

Minamimoto, T., Hori, Y., Kimura, M. (2009) "Roles of the thalamic CM-PF complex-basal ganglia circuit in externally driven rebias of action". *Brain Research Bulletin*, 78, 75-79.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G.(1998). "Dopamine receptors: From structure to function". *Physiological reviews*. 78, 189-225.

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

Nambu, Atsushi (2007) "Globus pallidus internal segment". *Progress in Brain Research*, 160: 135-150.

Nestler, E., Imán, S., Malenka, R.(2001). "Synaptic Transmission". *Molecular neuropharmacology*, Ed: Mc Graw-Hill. United States of America, pp.59.

Newman-Tancredi, A., Audinot, V., Chaput, C., Verrielle, L., Millan, M.J. (2007) "Guanosine-5'-O-(3-thio) triphosphate binding as a measure of efficacy at human recombinant dopamine D4.4 receptors: actions of antiparkinsonian and antipsychotic agents". *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, 282, 181-191.

Newman-Tancredi, A., Cussac, D., Audinot, V., Nicolas, J.P., De Ceuninck, F., Boutin, J.A., Millan, M.J. (2002) "Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D(2)-like receptor and alpha(1)/alpha(2)-adrenoceptor". *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, 303, 805-814.

Oak, J.N., Oldenhof, J., Huber, H.M., Van Tol. (2000). "The dopamine D4 receptor: one decade of research". *European Journal of Pharmacology*. 405, 303-327.

Oak, J.N., Lavine, N., Van Tol, H.H.M. (2001). "Dopamine D4 and D2L receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway is dependent on transactivation of the platelet-derived growth factor receptor". *Molecular Pharmacology*. 60, 92-103.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S. (2000) "Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors". *J Biol Chem*, 275, 17201–17210.

Obeso, J.A., and Lanciego, J.L. (2011) "Past, present, and future of the pathophysiological model of the basal ganglia". *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 1-6.

Parent, A., Hazrati, L-NA. (1995)"Functional anatomy of the basal ganglia: I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop". *Brain Research Reviews*, 20:91-127.

Pillai, G., Brown, N.A., McAllister, G., Milligan, G., Seabrook, G.R. (1998). "Human D2 and D4 dopamine receptors couple through $\beta\gamma$ G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a *Xenopus* oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively". *Neuropharmacology*. 37, 983-987.

Poirier, L.J., Giguere, M., Marchand, R. (1983). "Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat". *Brain Research Bulletin*. 11, 371-397.

Radnikow, G., and Misgeld, U. (1999) "Dopamine D1 receptors facilitate GABA_A synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata". *Journal of Neurosciences*, 18, 2009-16

Richards, C.D., Shiroyama, T., Kitai, S.T. (1997) "Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat". *Neuroscience*. 80, 545-557.

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

Rommelfanger, K.S. and Wichmann, T. (2010) "Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia". *Frontiers in Neuroanatomy*, 139.

Schwartz, J.C., Diaz, J., Bordet, R., Griffon, N., Perachon, S., Pilon, C., Ridray, S., Sokoloff, P. (1998) "Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence". *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 236-242.

Shen, K.Z. and Johnson, S.W. (1997) "Presynaptic GABAB and adenosine A1 receptors regulate synaptic transmission to rat substantia nigra reticulate neurons". *Journal of Physiology*, 505, 153-63.

Shin, R.M., Masuda, M., Miura, M., Sano, H., Shirasawa, T., Song, W.J., Kobayashi, K., Aosaki, T. (2003) "Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons". *Journal of Neuroscience*, 23, 11662-72.

Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D. (1999). "GABA receptor physiology and pharmacology". *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Ed. American Society for Neurochemistry. Sixth edition.

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

Smith, Y. and Bolam, J.P. (1991) "Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus Pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labeling study". *Neuroscience*, 144, 45-73.

Smith, Y., Raju, D.V., Pare, J.F., Sidibe, M. (2004) "The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry". *Trends in Neuroscience*, 27, 520-527.

Smith, Y., Raju, D., Nanda, B., Pare, J.F., Galvan, A., Wichmann, T. (2009) "The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states". *Brain Research Bulletin*, 78, 60-68.

Smith, Y. and Villalba, R. (2008) "Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: An overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains". *Movement Disorders*,

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

Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E., Gross, C. (2006) "The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders". *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5, 25-43.

Strahlendorf, H.K. and Barnes, C.D. (1983) "Control of substantia nigra pars reticulata neurons by nucleus accumbens" *Brain Research Bulletin*, 11, 259-263.

Sun, D., Wilborn, T.W., Schafer, J.A. (1998). "Dopamine D4 receptor isoform mRNA and protein are expressed in the rat cortical collecting duc". *The American Journal of Physiology*. 275, F742-F751.

Surmeier, D.J.,argas, J., Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C., Greengard, P. (1995). "Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neuron". *Neuron*. 14, 385-397.

Surmeier, D.J., Song, W.J., Yan, Z. (1996) "Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons". *Journal of Neuroscience*, 20, 6579-91.

Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.A., Nairn, AC., Greengard, P. (2004). "DARPP-32: an integrator of neurotransmission". *Annual Revision of Pharmacology-Toxicology*. 44, 269-296.

Tang, T.-S., Tu, H., Chan, E.Y., Maximov, A., Wang, Z., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Bezprozvanny, I. (2003). "Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence

neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1". *Neuron*. 39, 227-239.

Terrillon, S. and Bouvier, M. (2004) "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization". *EMBO Rep*, 5, 30-34.

Wang, X., Zhong, P., Yan, Z. (2002). "Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex". *Journal of Neurosciences*. 22, 9185-9193.

Walass, I. and Fonnum, F. (1980) "Biochemical evidence for γ -aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to substantia nigra and ventral tegmental area in the rat" *Neuroscience*, 5, 63-72.

Wallmichrath, I., and Szabo, B. (2002). "Analysis of the effect of cannabinoids on GABAergic neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*. 365, 326-334.

Waters, N., Svensson, K., Haadsma-Svensson, S.R., Smith, M.W., Carlsson, A. (1993) "The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity". *Journal of Neural Transmission Gen Sect*, 94, 11-19.

Watts, V.J., Vu, M.N., Wiens, B.L., Jovanovic, V., Van Tol, H.H., Neve, K.A. (1999). "Short- and long-term heterologous sensitization of adenylate cyclase by D4 dopamine receptors". *Psychopharmacology*. 141, 83-92.

Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.H., O'Dowd, B.F., Brann, M.R. (1991). "Dopamine D1 and D2 receptor mRNA expression in rat brain". *PNAS*. 88, 1859-1863.

Wichmann, T. and Dostrovsky, J.O. (2011) "Pathological basal ganglia activity in movement disorders". *Neuroscience*, 198, 232-244.

Windels, F., Kiyatkin, E.A. (2006) "GABAergic mechanisms in regulating the activity state of substantia nigra pars reticulata neurons". *Neuroscience*. 140:1289-1299.

Yung, W.H., Hausser, M.A., Jack, J.J. (1991). "Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurons of the guinea-pig substantia nigra pars compacta in vitro". *The Journal of Physiology*. 436, 643-667.

Zhou, F.M., and Lee, C.R. (2011) "Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons" *Neuroscience*, 1-26.

Zheng, T. and Wilson, C.J. (2002) "Corticostriatal combinations: the implications of corticostriatal axonal arborizations" *The Journal of Neurophysiology*, 87, 1007-1017.

