



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**PAPEL DE LOS RECEPTORES D3 EN LA INTERACCIÓN
RECÍPROCA DE DOPAMINA/ GLUTAMATO/ GABA EN LA
SUSTANCIA NIGRA RETICULADA: EFECTO DE LA
DENERVACIÓN DOPAMINÉRGICA**

T E S I S

Que presenta

M.C. MARINA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Benjamín Florán Garduño

Ciudad de México

diciembre 2019

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios 4 y 7 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del D.C. Benjamín Florán Garduño y con el proyecto financiado por CONACYT.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Ganglios Basales	6
1.1.1 Núcleo Estriado.....	7
1.1.2 Globo Pálido	8
1.1.3 Núcleo Subtalámico.....	9
1.1.4 Sustancia Nigra	9
1.1.4.1 Sustancia Nigra Compacta.....	10
1.1.4.2 Sustancia Nigra Reticulata	10
1.2 Circuito de los ganglios basales y su participación en la conducta motora	12
1.2.1 Enfermedad de Parkinson	14
1.2.1.1 Circuito de los Ganglios Basales durante la enfermedad de Parkinson	15
1.2.1.2 Tratamientos para la Enfermedad de Parkinson.....	16
1.2.1.2 Modelo experimental de Parkinson con 6-OHDA	17
1.3 Dopamina y receptores dopaminérgicos	18
1.3.1 Síntesis, liberación y metabolismo de la dopamina.....	19
1.3.2 Receptores dopaminérgicos.....	20
1.3.2.1 Familia D1-like	20
1.3.2.1.1 Receptor D1	21
1.3.2.1.2 Receptor D5	22
1.3.2.2 Familia D2-like	23
1.3.2.2.1 Receptor D2	24
1.3.2.2.2 Receptor D3	24
1.3.2.2.3 Receptor D4	26

1.4 Neurotransmisión de la sustancia nigra reticulata	27
1.4.1 GABA	28
1.4.2 Glutamato	30
1.4.3 Dopamina.....	32
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	33
2.1 Interacción entre los neurotransmisores dopamina, glutamato y GABA en la sustancia nigra pars reticulata.....	33
2.2 Participación del receptor D3 en la neurotransmisión de la SNr y la conducta motora	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPOTESIS.....	37
6. OBJETIVOS.....	37
6.1 Objetivo General	37
6.2 Objetivos Específicos	37
7. METODOLOGÍA.....	38
7.1 Animales de experimentación	38
7.3 Conducta de Giro	38
7.4 Implantación de Cánula guía.....	39
7.5 Experimentos de Microdiálisis	39
7.5 Actividad Motora.....	40
7.6 Cuantificación de Dopamina por HPLC	41
7.7 Cuantificación de GABA y glutamato por HPLC.....	41
7.8 Histología	42
7.9 Análisis Estadístico	42
8. RESULTADOS	43
8.1 El bloqueo del receptor D3 incrementa la concentración de glutamato, dopamina y GABA en la SNr de ratas en libre movimiento	43

8.2 Efectos del bloqueo del receptor D3 dependientes del receptor D1 sobre la liberación de GABA y Glutamato.....	44
8.3 Los incrementos de la liberación de Glutamato y GABA por el bloqueo del receptor D3 dependen de dopamina endógena	45
8.4 El bloqueo sistémico del receptor D3 mimetiza el efecto del bloqueo intranigral del receptor D3, papel del receptor D1	47
8.5 Efecto del bloqueo sistémico de los receptores D1 y D3 sobre los efectos neuroquímicos y conductuales producidos por la L-Dopa	48
9. DISCUSIÓN	59
9.1 Fármacos utilizados	59
9.2 Efecto de la perfusión de GR103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato; y sobre la actividad motora	60
9.3 Interacción recíproca entre glutamato, dopamina y GABA, y efectos motores producidos por bloqueo intranigral del receptor D3.....	62
9.4 Efectos conductuales del bloqueo local y sistémico del receptor D3	67
9.5 Efecto neuroquímico y motor de la L-dopa en condiciones de Parkinson experimental	69
10. CONCLUSIONES.....	72
11. BIBLIOGRAFÍA.....	73

ABREVIATURAS

AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CPu	Caudado-Putamen (Estriado)
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EPSCs	Corrientes postsinápticas excitatorias
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLU	Glutamato
GP	Globo Pálido
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GPe	Globo Pálido externo
GPi	Globo Pálido interno
HVA	Ácido Homovanílico
KO	Knock out
L-Dopa	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
DRD1	Receptor a dopamina D1
DYN	Dinorfina
ENK	Enkefalina
EP	Enfermedad de Párkinson
GB	Ganglios Basales
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GST	Glutación-S-Transferasa
MSN	Neuronas espinosas medianas
NE	Núcleo Estriado
PKA	Proteína cinasa A
SNr	Sustancia nigra reticulada
SP	Sustancia P
VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
SNc	Sustancia nigra compacta

RESUMEN

La sustancia nigra reticulada (SNr) es el núcleo donde se filtra y procesa la información proveniente de aferencias excitatorias e inhibitorias del circuito de los ganglios basales (GB), la integración de esta información resulta en la ejecución del movimiento voluntario. La actividad de las neuronas de la SNr es modulada por los neurotransmisores: glutamato, dopamina y GABA, través de distintos tipos de receptores presinápticos. Entre dichos receptores se encuentran los dopaminérgicos, los cuales por su ubicuidad en los GB y especialmente en la SNr, revisten gran relevancia.

En ese sentido, se tiene conocimiento de que el receptor D3 se encuentra expresado en terminales subtalamo-nigrales, estriado-nigrales y en las dendritas de la sustancia nigra compacta, adicionalmente se sabe que la activación *in vivo* de dicho receptor disminuye la actividad motora en animales. Además, la localización del receptor D3 junto con estudios *in vitro* que han mostrado que modula la liberación del neurotransmisor de la terminal donde se encuentra, indican su posible influencia sobre la vía nigro-talámica y por consecuencia en la actividad motora.

La escasa información acerca de la participación de los receptores D3 presinápticos en el control del movimiento, aunado a la gran importancia de la modulación dopaminérgica para la generación del mismo, llevaron a desarrollar el presente trabajo. En este trabajo se investigó la función de dichos receptores en condiciones fisiológicas, Parkinson experimental y en el tratamiento con L-Dopa. Para ello, se realizó la medición de los neurotransmisores dopamina, GABA y glutamato a través de experimentos de microdiálisis de ratas en libre movimiento mediante HPLC y se realizó una evaluación de la actividad motora de las mismas para establecer una correlación entre ambos parámetros.

La perfusión del antagonista D3 GR103691 en la SNr, así como la administración sistémica del antagonista D3 U991194 en condiciones fisiológicas, produjo un incremento local de glutamato, dopamina y GABA, acompañado por un incremento simultaneo en la actividad motora del animal; indicando la posible actividad tónica del receptor D3.

El bloqueo local concomitante de los receptores D3 y D1 (SCH23390) no afectó el incremento en el nivel de dopamina, pero redujo el de glutamato, previno el de GABA y además previno los efectos sobre la actividad motora. Interesantemente, se comprobó que el glutamato liberado por el bloqueo del receptor D3 estimula la liberación de dopamina mediante la activación de receptores NMDA, ya que el bloqueo con ácido kinurénico previno el incremento de dopamina y adicionalmente el de GABA y glutamato. De manera similar, el bloqueo intranigral del receptor D1 previo a la administración sistémica de U99194A disminuyó los incrementos de los neurotransmisores y la actividad motora. Estos resultados resaltan el rol de los receptores D1 y D3 en el control motor y ayudan a explicar los efectos de la administración *in vivo* de drogas dirigidas al receptor D3.

Por otra parte, la coadministración de GR103691 y L-Dopa en condiciones de Parkinson experimental produjo un incremento mayor de glutamato comparado con el que produce la administración de L-Dopa *per se*. Por lo anterior, es posible que la dopamina producida a partir de la L-Dopa, esté activando a los receptores D3 subtálamo-nigrales y por lo tanto se reduce la liberación de glutamato de estas terminales, lo que disminuye la actividad del núcleo de salida y por lo tanto se promueve el movimiento.

Los resultados sugieren que los receptores D3 nigrales son cruciales para la modulación de los neurotransmisores que influyen a la SNr, ya que a través de su actividad tónica contribuyen a la producción del movimiento por distintos mecanismos. Por lo tanto, el presente trabajo podría sugerir al receptor D3 como un probable blanco terapéutico durante el tratamiento con L-Dopa, ya que la activación del mismo podría favorecer el efecto de dicho fármaco durante la EP: la regeneración del movimiento.

ABSTRACT

Substantia nigra reticulata (SNr) is a nucleus where the excitatory and inhibitory inputs of basal ganglia circuit (BG) are filtered and processed, the integration of this information results in the execution of voluntary movement. The activity of SNr neurons is modulated by glutamate, dopamine and GABA, through different types of presynaptic receptors. Among these receptors, Dopaminergic Receptors are of great relevance, due to their ubiquity in the BG, especially in SNr.

It is known that D3 dopamine receptors (D3DRs) are expressed in subthalamo-nigral, striato-nigral terminals and in dendrites of Substantia Nigra Compacta (SNc); additionally, it has been shown that, *in vivo* activation of such receptors decreases motor activity in animals. In addition, *in vitro* studies have shown that D3DRs modulate the release of the neurotransmitter from the terminal where it is located, acting as an auto-receptor; all these findings indicate their influence on the nigro-thalamic pathway and, consequently, on motor activity.

Nevertheless, the lack of information about the role of presynaptic D3 receptors both in neurotransmitter release and control of movement simultaneously *in vivo*, as well as how the different neurotransmitters in SNr interact, led to the development of this work. We investigated the function of these receptors in physiological conditions, in an experimental Parkinson's disease model and in the treatment with L-Dopa, by collecting dopamine, GABA and glutamate through micro dialysis in freely-movement rats and measuring these neurotransmitters by HPLC. An evaluation of motor activity was also performed to establish a correlation between both neurotransmission and behavior.

Perfusion of GR103691 in SNr, as well as systemic administration of U991194, D3DRs antagonists, under physiological conditions, produced a local increase in glutamate, dopamine and GABA, accompanied by a simultaneous increase in motor activity; indicating the possible tonic activity of D3DRs.

Concomitant local blockade of D3DRs (GR103691) and D1DRs (SCH23390) did not affect dopamine levels, but reduced the glutamate amount, also preventing an increase on GABA and thus preventing the effects on motor activity. Interestingly, it was found that glutamate, released due to D3DRs blockade, stimulates the release of dopamine through NMDA receptors activation, since the blockade with kynurenic acid prevented the increases in dopamine, and also in GABA and glutamate levels. Similarly, D1DR intranigral blockade prior to systemic administration of U99194A prevented the increase in neurotransmitters levels and motor activity. These results highlight the role of D1DRs and

D3DRs in motor control and help explain the effects of *in vivo* administration of drugs that target D3DRs.

On the other hand, the co-administration of GR103691 and L-Dopa under experimental Parkinson's conditions produced a greater increase in glutamate compared to that produced by the administration of L-Dopa alone. Therefore, it is possible that the dopamine produced from L-Dopa, is activating the subthalamo-nigral D3 receptors and reducing the release of glutamate from these terminals, which decreases the activity of SNr and therefore promoting movement.

Our results suggest that nigral D3DRs are crucial for the modulation of the neurotransmitters that influence the SNr, and their tonic activity contributes to the promotion of movement through different mechanisms. Therefore, the present work could suggest the D3 receptor as a probable therapeutic target during treatment with L-Dopa, since its activation could favor the effect of this drug during PD: the regeneration of movement.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ganglios Basales

El movimiento voluntario es el resultado de patrones temporales y espaciales de contracciones musculares que a su vez son iniciadas y controladas por varias estructuras del sistema nervioso central. El control fino de dichas estructuras y las redes neuronales involucradas son cruciales en la ejecución del movimiento, así como en otras conductas aún más complejas.

La ejecución del movimiento requiere la interacción de diversas estructuras del sistema nervioso central y periférico. La organización de dichas estructuras se considera jerárquica, por lo que la señal de inicio del movimiento fluye de un nivel superior a uno inferior. El nivel más alto es la corteza cerebral motora que dirige sus comandos al cerebelo y **Ganglios Basales** (GB; *nivel medio*), mientras que el nivel inferior está conformado por motoneuronas de la médula espinal y de núcleos motores tronco-encefálicos. El movimiento voluntario se inicia conscientemente en la corteza motora y la corteza de asociación, dichas áreas cerebrales planean la actividad y coordinan su secuencia de acuerdo al contexto ambiental, dirigiendo el proceso a través de estructuras subcorticales.

Los GB conectan la corteza cerebral con sistemas neuronales que transforman la actividad cortical en un comportamiento dirigido a objetos. Las funciones principales que han sido atribuidas a los GB incluyen el aprendizaje motor, formación de hábitos y la selección de acciones basadas en resultados deseados (Wichmann and DeLong, 2003; Yin and Knowlton, 2006). Aunque este conjunto de núcleos se ha definido como un *sistema modulador fino de la conducta motora*, tiene la característica de operar en paralelo con sistemas de salida corticales para dirigir la ejecución de otras conductas. Actualmente se conoce que existen diferencias anatómicas de los GB entre especies, particularmente por la especialización de la corteza en mamíferos superiores; sin embargo, la organización funcional de los GB es altamente conservada y casi idéntica en diferentes géneros.

Los GB están conformados por grupos definidos de neuronas en la base del cerebro (Figura 1). Los GB localizados en el telencéfalo son el Núcleo Estriado (NE), dividido en caudado y putamen en el caso de los primates; el Globo Pálido interno o medial (GPi); el Globo Pálido externo (GPe); el Núcleo Subtalámico (NST) y localizados en el mesencéfalo se encuentran la Sustancia Nigra Reticulata (SNr) y compacta (SNc). Este grupo de núcleos se encuentran interconectados con el tálamo, la corteza cerebral (Cx) y el tronco del encéfalo. La comunicación entre los GB y los núcleos complementarios permite la modulación del movimiento voluntario a través de un circuito neuronal clásicamente conocido como circuito de los ganglios basales que se abordará más adelante (Ghez *et al.* 1991).

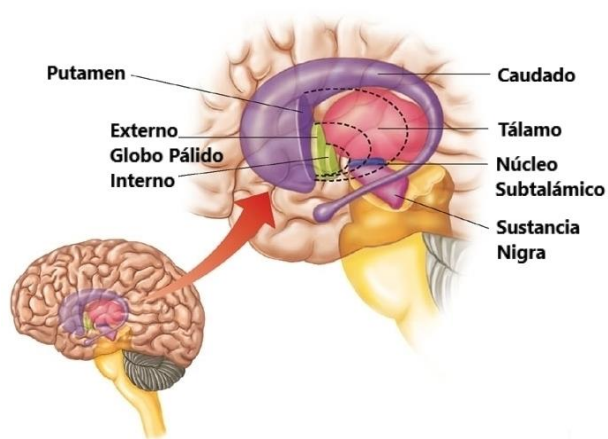


Figura 1. Localización anatómica de los ganglios basales.

1.1.1 Núcleo Estriado

El NE es la principal vía de entrada de información proveniente de la corteza hacia el circuito de los GB. Está conformado por un 95% de neuronas espinosas medianas (NEM) de naturaleza GABAérgica, además de un 5% de interneuronas colinérgicas y GABAérgicas. De las NEM existentes, aproximadamente el 50% se caracterizan por expresar al receptor dopaminérgico D1, liberan además de GABA, sustancia P (SP) o dinorfina y proyectan principalmente hacia la SNr, estas proyecciones constituyen la vía directa de los GB. El 50% de NEM restante expresa receptores dopaminérgicos D2, colibera encefalina y GABA, y proyecta hacia el GPe como primer relevo de la vía indirecta del circuito mencionado

(Gerfen 1990; Surmeier 1996). Las neuronas estriato-nigrales también expresan al receptor dopaminérgico D3 (Ariano and Sibley, 1994; Diaz *et al.*, 1995; Surmeier *et al.*, 1996), el cual co-localiza con el receptor D1, formando un heterodímero (Fiorentini *et al.*, 2008) que potencia la liberación de GABA hacia la SNr cuando ambos receptores son co-activados (Cruz-Trujillo *et al.*, 2013).

Con respecto a la innervación del NE, las aferencias de carácter glutamatérgico provienen principalmente de la corteza cerebral y del tálamo, mientras que las aferencias dopaminérgicas provienen de la SNc (Parent and Hazrati, 1995).

1.1.2 Globo Pálido

El Globo Pálido (GP) recibe su nombre debido a los axones que lo cruzan y que son abundantemente mielinizados, sus neuronas utilizan GABA como neurotransmisor y está localizado junto al putamen del NE para conformar el Núcleo Lenticular. La mayoría de las aferencias GABAérgicas del GP provienen del NE, de donde reciben información para transmitirla hacia el tálamo.

El GP recibe innervación glutamatérgica proveniente del NST y dopaminérgica de la SNc (Debeir 2005). El GP se divide en dos poblaciones neuronales, una medial o interna (GPi) y una porción dorsal o externa (GPe), ambas poblaciones utilizan GABA como neurotransmisor. El GPi forma parte de los núcleos de salida de información en el circuito de los GB y proyecta también axones hacia el tálamo (Smith y Bolam 2000), mientras que el GPe proyecta axones hacia el Núcleo Reticular del Tálamo (NRT), NST y SNr.

Las neuronas palidales expresan al receptor dopaminérgico D4 (Ariano *et al.*, 1997) tanto en el soma (Mrzljak *et al.*, 1996), como en las proyecciones hacia el NST, NRT (Flores *et al.*, 1999; Floran *et al.*, 2004b; Floran *et al.*, 2004a) y a la SNr (Khan *et al.*, 1998; Acosta-Garcia *et al.*, 2009; Erlij *et al.*, 2012).

1.1.3 Núcleo Subtalámico

El NST es un núcleo de naturaleza glutamatérgica, que proyecta sus axones principalmente hacia la SNr y el GPe (Kita and Kitai, 1987), aunque también se han descrito proyecciones al NE y GPi. Por su localización anatómica y naturaleza glutamatérgica, el papel del NST se considera estratégico para controlar el procesamiento de señales entre estructuras de entrada y salida del circuito de los GB. En ese sentido, el NST ejerce un rol esencial en el disparo tipo ráfaga que presentan las neuronas de la SNc (Smith-Grace 1992) y de la SNr (Maurice 2003).

Por otra parte, el NST recibe su mayor entrada de información de neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral (Canteras et al., 1990). Se ha comprobado a través de estudios de *binding* una alta densidad de receptores AMPA y Kainato, y en menor cantidad receptores NMDA (Canteras et al., 1990). De igual manera, el NST cuenta con una entrada GABAérgica inhibitoria importante proveniente del GPe (Feager, 1981; Vincent et al., 1982b). Además, el NST recibe dopamina de proyecciones provenientes de la SNc, (Hassani et al., 1997). Finalmente, un grupo pequeño de neuronas del núcleo pedúnculo pontino, provee acetilcolina al NST; mientras que el núcleo del rafe lo inerva con proyecciones serotoninérgicas (Canteras et al., 1990).

1.1.4 Sustancia Nigra

La SN se encuentra localizada en el mesencéfalo, formando parte de los GB. La SN está constituida por un conjunto de neuronas divididas en dos poblaciones anatómica y funcionalmente distintas: la SNc se localiza en la parte dorsal y está densamente poblada, mientras que las neuronas de la SNr son menores en número.

1.1.4.1 Sustancia Nigra Compacta

La SNc está conformada por neuronas dopaminérgicas que se tiñen de negro, gracias a la neuromelanina (Blandini *et al.*, 2000). La SNc envía proyecciones hacia el NE, el GPe y el NST, además de irrigar a la SNr con dopamina proveniente de sus dendritas (Patel 2013).

La SNc recibe aferentes glutamatérgicas del núcleo subtalámico (Carter, 1982), colinérgicas del núcleo pedúnculo pontino (Bezard y Gross 1998) y GABAérgicas del NE, GPe (Blandini *et al.*, 2000) y SNr (Hajos and Greenfield, 1993; Tepper *et al.*, 1995). Las neuronas de este núcleo expresan una gran variedad de receptores, entre ellos los NMDA y GABA_A. En su soma y terminales se ha destacado la presencia de autorreceptores D2 (Santiago and Westerink, 1991), así como receptores a dopamina D3. Es importante destacar que la degeneración y muerte de las neuronas de la SNc es la causa de la enfermedad de Parkinson (EP), en la cual se afectan circuitos motores que son cruciales para la generación y control del movimiento (Obeso *et al.*, 2000), produciendo el cuadro de síntomas motores característico de la mencionada enfermedad.

1.1.4.2 Sustancia Nigra Reticulata

La SNr es el principal núcleo de salida de información de los GB y se considera un integrador y transmisor de la información hacia el tálamo. La SNr se encuentra formada por un grupo de neuronas que en su mayoría se han descrito como fusiformes, ovoides, triangulares y con axones cortos y pequeños (Ramon y Cajal 1909). A través de inmunohistoquímica se ha comprobado que estas células expresan la enzima Descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) y más del 80% parvoalbumina (PV) (González-Hernández and Rodríguez 2000). Aunque la inmensa mayoría de las neuronas de la SNr son de carácter GABAérgico, también se pueden encontrar neuronas dopaminérgicas y colinérgicas (González-Hernández 2000, Martínez-Murillo 1989) y recientemente se ha propuesto que hay un subgrupo de neuronas que usan glutamato como neurotransmisor (Antal *et al.*, 2014). La SNr envía sus axones principalmente hacia el Tálamo (Beckstead and Frankfurter, 1982), tronco encefálico, colículo superior (Lee and Tepper, 2007), SNc y hacia sus propias neuronas (Mailly 2003).

Entre las principales aferentes de la SNr se han descrito proyecciones GABAérgicas provenientes del NE (Deniau et al., 1994) y del GPe (Smith and Bolam, 1989, 1990a). Adicionalmente, la SNr recibe dopamina proveniente de la liberación dendrítica de la SNC principalmente (Cheramy et al., 1981), la cual es modulada por el receptor D2 presináptico (Figura 2). A su vez, dicha dopamina juega un rol importante en la modulación GABAérgica de la SNr a través de receptores D1 presentes en las terminales estriado-nigrales y es crucial en el mecanismo para el control motor que ejercen los GB (Gash et al., 1996; Robertson, 1992a). Por otra parte, existe prominente inervación glutamatérgica que proviene del NST (Nakanishi et al., 1987), cabe señalar que en la SNr se encuentran expresadas prácticamente todas las clases conocidas de receptores a glutamato (Albin et al., 1992).

Además de recibir e integrar información del estriado dorsal, la SNr también está implicada en el procesamiento de información proveniente del estriado ventral o núcleo accumbens (NAc) que está relacionado con funciones límbicas y de recompensa (Haber and Knutson, 2010). Por ello la SNr se reconoce como un núcleo importante, no solo para la conducta motora, también para funciones límbicas y cognitivas del eje Corteza-Ganglios basales-Tálamo-Corteza.

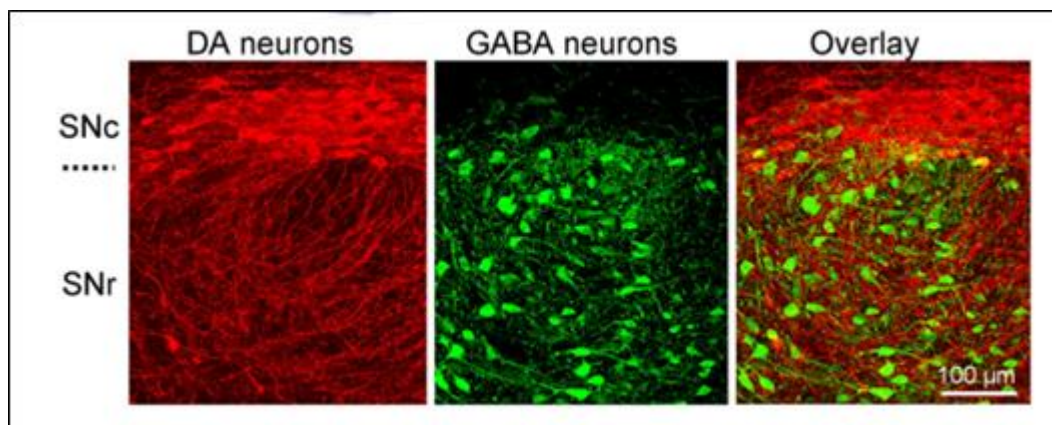


Figura 2. Inmunofluorescencia de la SN. Las neuronas de la SNr están marcadas con la proteína verde fluorescente y las neuronas de la SNC están marcadas en rojo con un anticuerpo contra la Tiroxina Hidroxilasa (TH). Tomado de Zhou & Lee., 2011.

La SNr (Figura 3) cuenta con aferentes del NE (Bolam 2000), GPe (Shink et al., 1996), NST (Smith 1998) y SNc, de los cuales recibe e integra información para cumplir con el fin canónico de los GB: ejecución del movimiento voluntario (Deniau 2007). Cabe mencionar que la regulación de la actividad de las neuronas de la SNr puede ser modificada por péptidos, endocannabinoides y neuromoduladores, a través de las proyecciones GABAérgicas o glutamatérgicas ahí presentes. Sin embargo, el rol de regulación de la SNr más relevante ha sido otorgado a la dopamina, esto debido a la presencia de receptores a dopamina en todas las aferentes de los GB hacia la SNr, tema que será analizado en el presente trabajo.

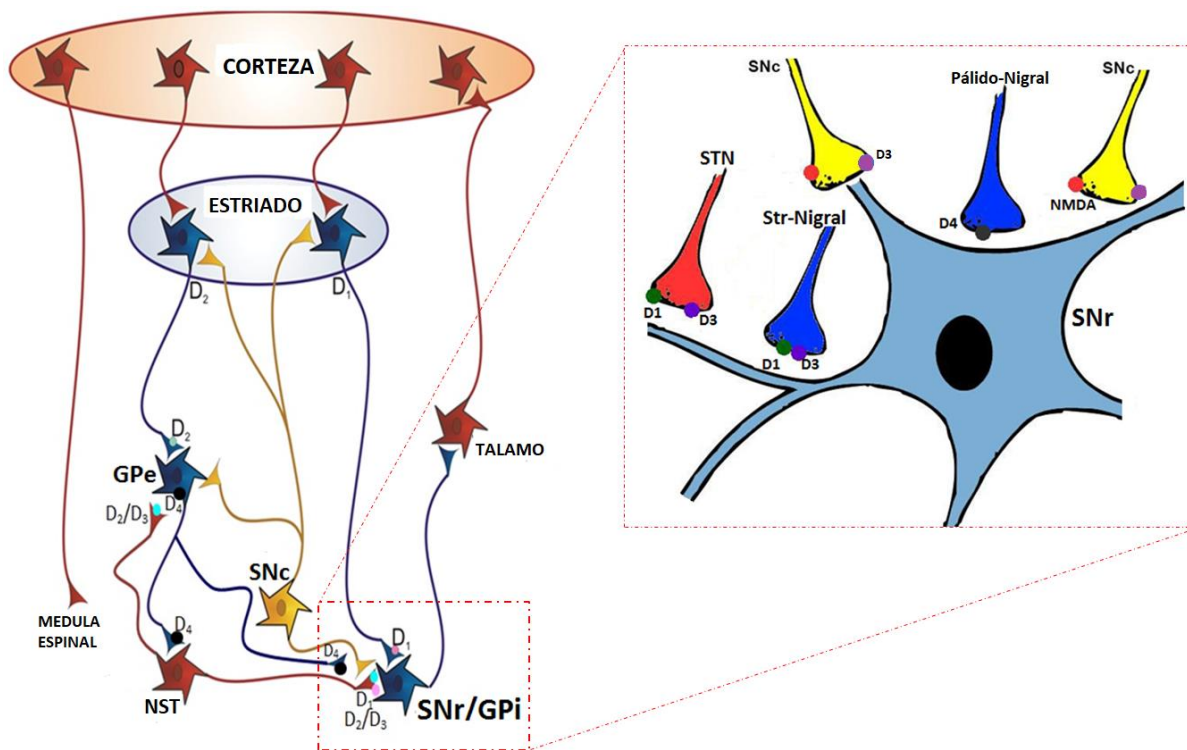


Figura 3. Esquema de la organización funcional de los ganglios basales. Representación gráfica de las aferencias y eferencias de la SNr.

1.2 Circuito de los ganglios basales y su participación en la conducta motora

El circuito de los GB es una red neuronal dirigida por la actividad de la corteza cuyas proyecciones son dirigidas al NE, considerado como el principal núcleo de entrada de información del circuito. A su vez, las neuronas estriatales se encuentran divididas en dos

poblaciones que proyectan axones hacia diferentes núcleos para generar las vías clásicas de los GB. El grupo de neuronas que conforman la vía directa y que expresan al receptor D1 manda sus proyecciones hacia la SNr. Por acción del glutamato cortical dichas neuronas, incrementan su actividad y aumentan la liberación de GABA a nivel de la SNr, además este evento se suma al efecto de la activación del receptor D1 (GPCR acoplado a G_s); resultando en la inhibición del complejo SNr/GPi, la activación del tálamo y finalmente la facilitación del movimiento.

La vía indirecta por su parte se origina a partir de la población neuronal que tiene como peculiaridad la expresión en sus terminales del receptor D2. Dichas neuronas proyectan sus axones hacia el GPe, el cual a su vez proyecta hacia el NST; dicha vía concluye con las proyecciones subtálamo-nigrales (Figura 3). La activación de la vía indirecta debido al glutamato cortical, produce un incremento de GABA a nivel del GPe, lo cual es en parte prevenido por la activación del receptor D2 estriado-palidal, esto le permite al GPe inhibir al NST y producir una menor activación de la SNr. La consecuencia final es la desinhibición del tálamo, lo cual complementaría a la vía directa favoreciendo el movimiento del individuo.

Recientemente, se ha descrito que la función de las vías directa e indirecta de los GB no es opuesta, sino complementaria. Marcajes específicos de ambas vías, así como trabajos con técnicas de optogenética han revelado que, tanto en el inicio del movimiento como en la ausencia del mismo, las vías de este circuito se encuentran activas en mayor o menor medida. De manera interesante, se ha postulado que la vía directa debe estar más activa en el movimiento que durante la inmovilidad y que la vía indirecta debe tener más actividad en la inmovilidad que en el movimiento (Costa 2013). Figura 4.

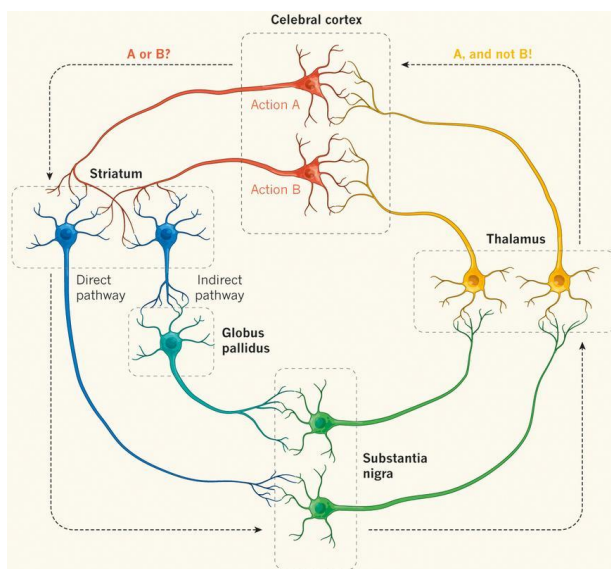


Figura 4. Modelo del circuito de los GB. Tomado de Costa *et al* 2013.

1.2.1 Enfermedad de Parkinson

La EP es un desorden neurodegenerativo y progresivo que resulta de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNC. La pérdida de proyecciones nigrales al estriado produce dificultades con el movimiento, incluyendo rigidez, inestabilidad postural, temblor en reposo, bradicinesia y acinesia. Adicionalmente, en la mayoría de los pacientes se presentan síntomas no motores como somnolencia, enlentecimiento gástrico, disfunción cognitiva y depresión, los cuales afectan considerablemente su calidad de vida (Chaudhuri and Odin, 2010).

La EP afecta a aproximadamente una de cada 100 personas mayores de 60 años en el mundo. Actualmente, se ha estimado que hay aproximadamente 6.3 millones de personas con esta enfermedad y la OMS prevé que para el 2030 esta cantidad se duplique.

Entre los factores de riesgo para la enfermedad se encuentra el riesgo de género de masculino 3: femenino 2, una incidencia mayor en hispanos, la cual decrece en progresivamente en caucásicos no-hispanos, asiáticos y blancos (Van Den Eeden SK 2003). De manera relevante el riesgo aumenta de manera exponencial con la edad, por lo cual se espera que la enfermedad aumente al menos un 50% para el año 2030 (Dorsey ER 2007). Las causas de la EP no han sido claramente establecidas; sin embargo, se han relacionado algunos factores genéticos, ambientales e inmunológicos con la génesis de la enfermedad.

1.2.1.1 Circuito de los Ganglios Basales durante la enfermedad de Parkinson

La pérdida de dopamina lleva a una serie de alteraciones de los sistemas de neurotransmisión, lo cual tiene serias consecuencias en el balance de las vías del circuito de los GB. En concordancia con los modelos anatómicos y funcionales de los GB, la pérdida de control dopaminérgico lleva a una hiperactividad de la vía indirecta: la ausencia de dopamina produce falta de modulación del receptor D2 en las terminales estriado-palidales, lo cual lleva secuencialmente a la liberación aumentada de GABA sobre el GPe, la inhibición de las neuronas palidales e incremento en la actividad del NST que libera a su vez una mayor cantidad de glutamato en la SNr, finalmente esto provoca la inhibición del tálamo y consecuentemente del movimiento. (Figura 5). En el caso de la vía directa, la disminución del tono dopaminérgico lleva a una disminución en la liberación de GABA proveniente de las terminales estriado-nigrales y por lo tanto una inhibición menor del núcleo de salida. Por lo tanto, la disminución del tono dopaminérgico en las GB es crucial para la aparición de síntomas motores como la bradicinesia en la EP. Adicionalmente, se ha demostrado que los cambios neuroquímicos producidos durante la EP, se suman a una reorganización de los receptores a dopamina, que pueden cambiar sus niveles de expresión y sensibilidad a su ligando.

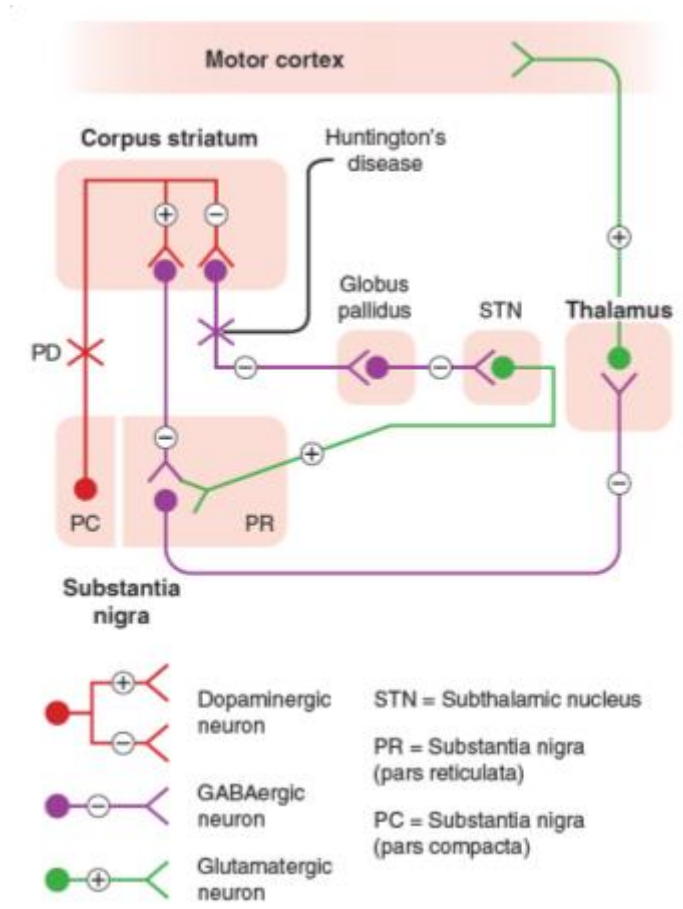


Figura 5. Diagrama simplificado de la organización del sistema motor extrapiramidal y las modificaciones que ocurren en la Enfermedad de Parkinson.

1.2.1.2 Tratamientos para la Enfermedad de Parkinson

200 años después del primer escrito con la descripción de la enfermedad, las terapias para EP disponibles son útiles solo para atenuar los síntomas de la misma, por lo cual la meta más ambiciosa en la terapia de EP, es diseñar fármacos con propiedades de alentar o incluso detener la degeneración progresiva de las neuronas en cuestión. Actualmente los fármacos más usados la L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa), agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la MAO B y menos frecuentemente amantadina (Connolly 2014). El tratamiento debe iniciarse al presentarse los síntomas motores con la finalidad de mejorar la función y la calidad de vida. En el caso particular de la L-Dopa, a pesar de su gran eficacia en las primeras etapas de la EP, la mayoría de los pacientes que la utilizan

desarrollan discinesias entre 5-10 años después del inicio de su uso (Brichta 2013). Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas que proporcionen alivio eficaz de la sintomatología, pero sin los efectos colaterales de la L-Dopa.

Actualmente, se dispone de formas de liberación prolongada (LP) de pramipexol y ropinirol y de administración transdérmica de rotigotina (Agonistas dopaminérgicos con preferencia en afinidad por el receptor D3), que contribuyen a una mayor estabilidad plasmática de los valores del fármaco. Se sabe que en la EP inicial los 3 fármacos mejoran de forma significativa las escalas de incapacidad de los pacientes, retrasan la aparición de discinesias y permiten retrasar la introducción de levodopa.

1.2.1.2 Modelo experimental de Parkinson con 6-OHDA

Los modelos animales de EP coinciden en que la depleción dopaminérgica incrementa la actividad de las neuronas estriado-palidales y disminuye la actividad de las neuronas estriado nigrales, lo cual lleva al desbalance en el control de los núcleos de salida de los GB, el tálamo y por lo tanto a la incapacidad de respuesta ante los comandos motores mayores. (Albin 1989).

Actualmente se considera que un modelo animal de EP debe cumplir con algunas características particulares: por ejemplo, contar con un grupo normal de neuronas dopaminérgicas y la pérdida gradual y selectiva de más del 50% de las mismas que comienza en la edad adulta, además de ser detectable con métodos bioquímicos y neuropatológicos. El modelo debe tener además déficits motores detectables, incluyendo bradicinesia, rigidez y temblor en reposo. Y por último, idealmente debería mostrar el desarrollo característico de cuerpos de Lewy.

En ese sentido, la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) fue uno de los primeros agentes farmacológicos usados para producir un modelo de parkinsonismo, esta molécula se acumula en las neuronas dopaminérgicas llevándolas a un estado de toxicidad por la producción de radicales libres. La 6-OHDA es una neurotoxina muy efectiva en ratas, ratones, gatos y primates, y se ha usado principalmente para producir modelos de lesión

unilaterales. En el caso de las ratas, la inyección de la neurotoxina se puede realizar directamente en la SNr, NE o el haz medial. Si el procedimiento se realiza correctamente, se produce la pérdida progresiva de alrededor de 90-95% de las neuronas dopaminérgicas. La efectividad de la lesión es evaluada mediante la inducción del giro por administración de anfetamina o apomorfina.

1.3 Dopamina y receptores dopaminérgicos

La dopamina es considerada como una de las catecolaminas más importante y abundante del sistema nervioso central. Su importancia ha incrementado con las evidencias de su participación en procesos neurológicos muy importantes como la cognición, ingesta alimentaria, la recompensa, las emociones y la función motora; así como también en funciones periféricas como la función cardiovascular, secreción hormonal, función renal y gastrointestinal. Las principales fuentes de dopamina en el sistema nervioso central son las vías nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular (Beaulieu and Gainetdinov, 2011) ver Figura 6.

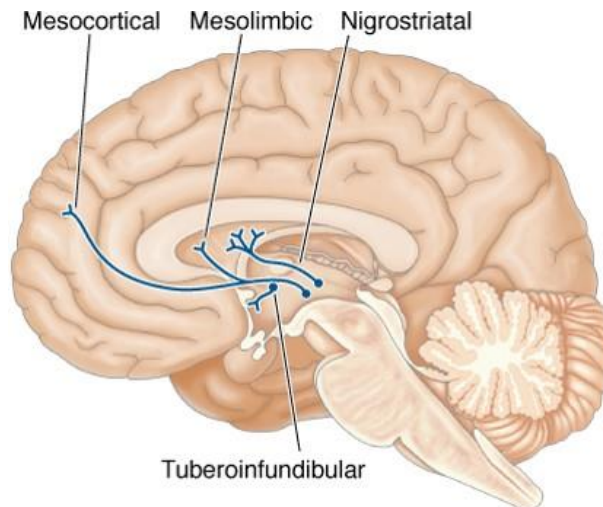


Figura 6. Vías dopaminérgicas cerebrales.

La dopamina ha sido objeto de investigación de manera importante los últimos 30 años, principalmente por las alteraciones a nivel del sistema nervioso central en las que se encuentra implicada directa o indirectamente.

1.3.1 Síntesis, liberación y metabolismo de la dopamina

La dopamina se sintetiza a partir de la tirosina, la cual ingresa a las neuronas dopaminérgicas a través de transporte activo. Inicialmente es transformada a L-Dopa por la enzima citoplasmática tirosina hidroxilasa (TH), la cual es dependiente del fosfato inorgánico disponible y es considerada la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Posteriormente, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) produce dopamina a partir de L-Dopa (Fig. 7) (Mendoza-Patiño, 2008).

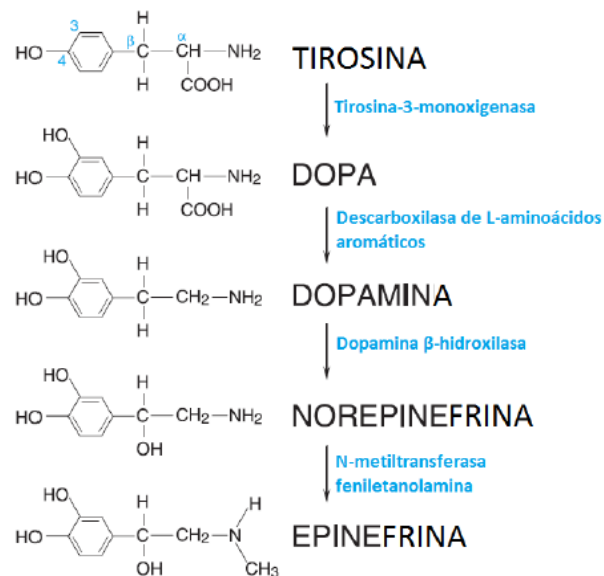


Figura 7. Síntesis y metabolismo de la Dopamina.

Por otra parte, la dopamina sintetizada es almacenada en vesículas mediante transportadores específicos (VMATs), dichas vesículas se fusionan a la membrana para liberar al mencionado neurotransmisor en respuesta a potenciales de acción. Es oportuno señalar que la liberación de dopamina depende ampliamente del patrón de disparo de la neurona a nivel del soma, axón o dendrita (Bloom *et al.*, 1995).

Finalmente, el metabolismo de la dopamina se lleva a cabo principalmente a través de dos enzimas: la enzima monoamino oxidasa (MAO), la cual transforma la dopamina en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y se expresa en neuronas dopaminérgicas y glia; y la

catecol-O-transferasa (COMT) que transforma la dopamina a ácido homovanílico (HVA) y se encuentra en neuronas postsinápticas y glía, (Elsworth and Roth, 1997).

1.3.2 Receptores dopaminérgicos

Las variadas acciones fisiológicas de la dopamina son mediadas por varios subtipos de receptores específicos. Entre las primeras evidencias de la existencia de estos receptores en el sistema nervioso central, se encuentra el hallazgo de que la dopamina estimula la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Brown and Makman, 1972; Keblavian 1972). Posteriormente, evidencias farmacológicas y bioquímicas demostraron que los receptores a dopamina son GPCRs que se pueden acoplar positiva o negativamente a la mencionada enzima. Estos hallazgos proporcionaron un razonamiento para clasificar a los receptores dopaminérgicos en las familias D1-like y D2-like.

Estas familias poseen distintas propiedades farmacológicas; por ejemplo, los receptores D2-like tienen alta afinidad por las benzamidas y las butirofenonas, así como por antagonistas como sulpiride y espiperona. Mientras que los receptores D1-like tienen afinidad por las benzacepinas y antagonistas como SCH 23390.

Con respecto a su estructura, los receptores D1-like tienen una tercera asa intracelular y carboxilo terminal de menor tamaño con respecto a los receptores D2-like. De manera interesante, actualmente existe evidencia de que los receptores a dopamina pueden formar oligómeros, que pueden ser homómeros -dos o más copias del mismo receptor- ó heterómeros -que incorporan más de un subtipo de receptor-, generando perfiles farmacológicos únicos y mecanismos de señalización distintos a los clásicos.

1.3.2.1 Familia D1-like

La familia D1-like está formada por los subtipos D1 y D5 cuya homología es alta (80%), especialmente en los dominios transmembranales, y por lo cual hasta ahora no ha sido posible diferenciarlos farmacológicamente (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Los receptores D1-like se encuentran ampliamente expresados en cerebro, con alta densidad

en el caudado putamen, NAc, SNr y bulbo olfatorio. Los receptores D1-like son GPCR's, los cuales se acoplan específicamente a proteínas G_s/G_{olf} , por lo cual al ser activados por su ligando promueven la activación de adenilato ciclasa, que a su vez estimula la producción de Adenosina monofosfato cíclico (AMPC), (Jackson and Westlind-Danielson, 1994) Figura 8. Clásicamente se ha descrito que a nivel neuronal el AMPC formado lleva a la activación de la cinasa PKA, cuya principal acción es la fosforilación de varios efectores entre ellos canales de calcio y potasio (Liu *et al.*, 1992a), lo cual incrementa la actividad neuronal.

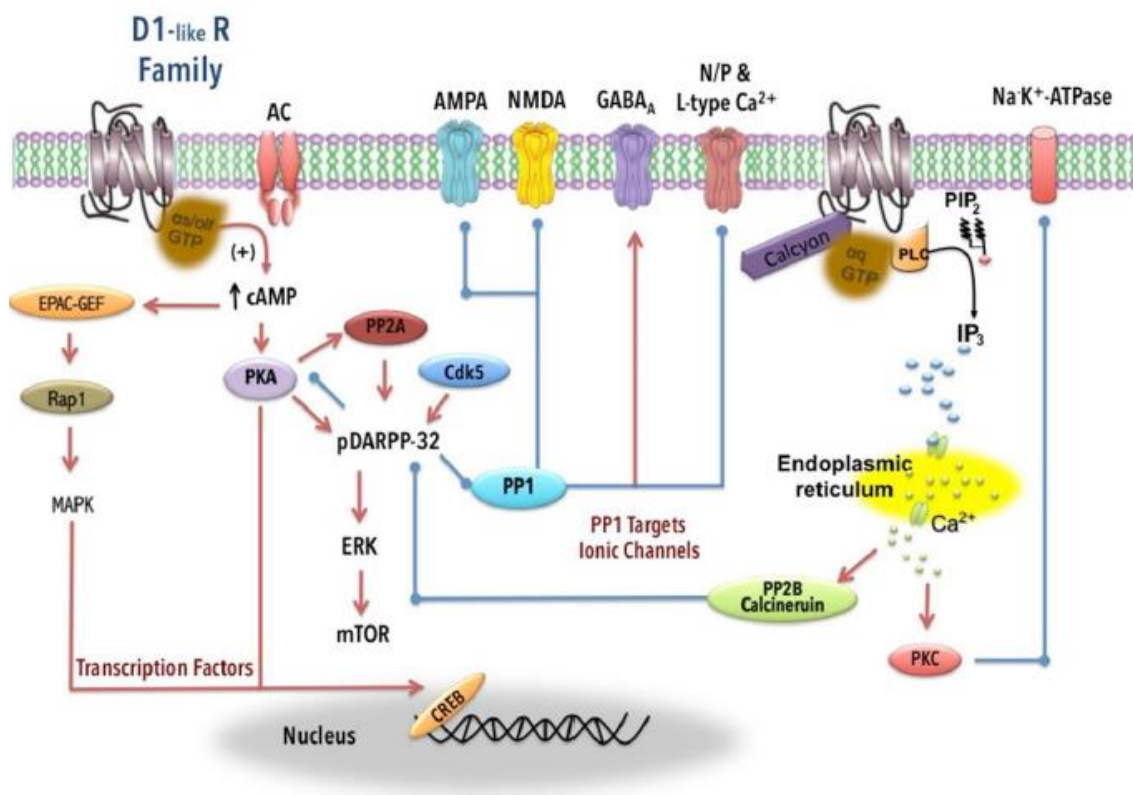


Figura 8. Señalización intracelular de los receptores de la familia D1. Tomado de Florán *et al.*, 2015.

1.3.2.1.1 Receptor D1

Los receptores D1 por lo general se localizan post-sinápticamente en neuronas que reciben dopamina, por ejemplo, las neuronas espinosas medianas del NE (Sokoloff 2006, Rankin 2010, Rondou 2010). Se ha descrito que el receptor D1 participa de manera importante en conductas como: sistemas de recompensa, aprendizaje y memoria. Estos

receptores se han localizado en la SN, Corteza, tubérculo olfatorio y NAc; también se han encontrado, aunque con menor expresión, en cerebelo, hipocampo, hipotálamo y tálamo (Caron 1993, Rankin 2010).

Entre las funciones del receptor localizado en las terminales estriado-nigrales (Bordet 2000), ha sido bien caracterizado que su activación tiene un efecto estimulador sobre la actividad locomotora y de manera contraria su bloqueo lleva a un efecto inhibitorio sobre la misma en varios modelos animales. Con respecto a su vía de señalización, como se mencionó anteriormente, la estimulación del receptor D1 lleva a la activación de la vía adenilato ciclasa→PKA, la cual tiene diversos blancos, como la inhibición de canales de sodio, inhibición de canales de potasio dependientes de voltaje, inhibición de canales rectificadores de corrientes entrantes de potasio, estimulación de canales de calcio tipo L, N, P, Q, NMDA y GABA (Neve 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que los receptores D1 pueden acoplarse a proteínas $G_{\alpha q}$ (esto en presencia de proteínas adaptadoras como calcyon), acción que lleva a la hidrólisis de fosfoinosítidos por activación de la Fosfolipasa C (PLC), dando lugar a la producción de inositol-3-fosfato (IP3) y diacilglicerol, esto produce la activación de receptores a IP3 en el retículo endoplásmico y la liberación de calcio proveniente de depósitos intracelulares (Lezcano 2000).

1.3.2.1.2 Receptor D5

Al igual que el receptor D1, el receptor D5 se ha encontrado en hipotálamo, hipocampo, NE, corteza y tubérculo olfatorio, aunque en menor cantidad (Missale 1998). Se ha demostrado que esta proteína de 477 aminoácidos tiene 10 veces menor afinidad por la dopamina que el receptor D1. En cuanto a su señalización, se ha descrito que su activación lleva también la activación de la vía AC→AMPC→PKA. Con respecto a su funcionalidad la información disponible es limitada; sin embargo, debido a su localización en los GB es posible que este modulando la actividad locomotora de una forma fina al igual que otros receptores dopaminérgicos de baja expresión.

1.3.2.2 Familia D2-like

Esta familia de receptores está conformada por los subtipos D2, D3 y D4. Los subtipos D2 y D3 tienen una homología del 75% en sus dominios transmembranales, por su parte D2 y D4 comparten 53% de homología (Missale 1998). Los receptores de esta familia tienen un asa intracelular de mayor tamaño en comparación con los receptores de tipo D1-like, característica común de receptores que se acoplan a proteínas $G_{\alpha i}$. Los receptores de esta familia se acoplan a $G_{\alpha i/o}$ por lo que su activación disminuye la actividad de adenilato ciclasa, produciendo la inhibición de la formación del segundo mensajero AMPc. La consecuencia funcional es la activación de canales de potasio e inhibición de canales de calcio (Figura 9) (De Camilli *et al.*, 1979; Stoof and Kebabian, 1981).

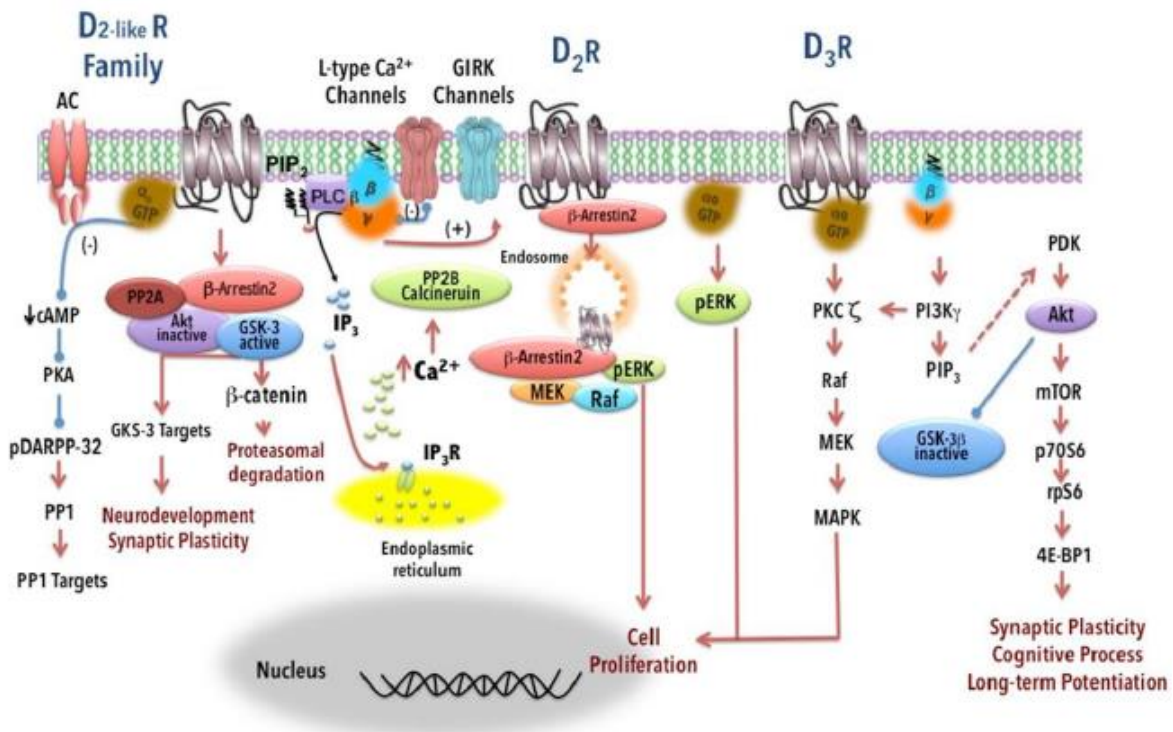


Figura 9. Señalización intracelular de los receptores de la familia de tipo D2. Tomado de Florán *et al* 2015.

1.3.2.2.1 Receptor D2

El receptor D2 se expresa principalmente en el NE, NAc y tubérculo olfatorio (Missale 1998) y en menor medida en la SNc, área ventral tegmental (VTA), hipotálamo y áreas corticales. Se ha descrito ampliamente que la activación de receptores D2 en terminales estriado-palidales favorece el incremento de la actividad locomotora en modelos animales, sinergizando su función sobre la inhibición de la liberación de GABA en el GPe y por lo tanto, atenuando la actividad de la vía indirecta de los GB.

El receptor D2 tiene dos isoformas que se generan por splicing alternativo, la isoforma corta (D2S) y la isoforma larga (D2L), la cual es 29 aminoácidos más grande. Dichas isoformas tienen distintas características de expresión, fisiología, farmacología y señalización. El receptor D2S se expresa generalmente a nivel presináptico y se sabe que está principalmente ejerciendo funciones de autorreceptor; por su parte, la forma D2L se encuentra generalmente de manera post-sináptica (Usiello 2000, De Mei 2009).

1.3.2.2.2 Receptor D3

Como miembro de la familia D2-like, el receptor D3 se acopla y activa proteínas $G_{ai/o}$ para inhibir la producción de AMPc y disminuir la actividad de PKA (Missale et al., 1998; Robinson and Caron, 1997). Adicionalmente, algunos estudios sugieren que el receptor D3 regula otras vías de señalización intracelular como la actividad de ERK1/2 y la cascada de Akt (Collo et al., 2008, 2012).

De manera interesante, se ha encontrado evidencia de la existencia de varias isoformas del receptor D3; sin embargo, estas moléculas no parecen ser funcionales. Particularmente, la isoforma D3nf ha tomado relevancia recientemente, esta presenta una secuencia de aminoácidos distinta en el extremo carboxilo terminal y carece de los dominios transmembranales 6 y 7. Existe evidencia de su capacidad de unirse a los receptores D3 funcionales en el citoplasma, disminuyendo la afinidad de estos por la dopamina (Elmhurst et al., 2000), impidiendo su anclaje a la membrana y su señalización (Karpa et al., 2000).

Interesantemente, el receptor D3 posee una afinidad por la dopamina mayor que la de cualquier otro receptor dopaminérgico (Missale et al., 1998), lo cual ha sido atribuido a las diferencias en su tercera asa intracelular con respecto a los otros receptores. El receptor D3 se ha encontrado en el sistema nervioso central a nivel del NAc, islas de calleja, GPi, cerebelo y NE. También ha sido detectado con una menor expresión en SNC, VTA, hipocampo y corteza.

Por otra parte, la existencia de fármacos de alta afinidad para el receptor D3 ha posibilitado explorar ampliamente sus funciones. Entre dichos fármacos los más utilizados en procedimientos experimentales son el agonista selectivo 7-OH-DPAT, con una afinidad diez veces mayor que para el receptor D2 y 650 veces mayor con respecto al receptor D4 (Seeman and Van Tol, 1994) y el antagonista GR 103691, el cual posee una afinidad 100 veces mayor por el receptor D3 en comparación al D2 y D4 (Audinot *et al.*, 1998).

El receptor D3 ha sido relacionado con numerosas funciones, incluyendo la recompensa y las conductas motivadas (Heidbreder, 2008), cognición (Nakajima et al., 2013) y locomoción (Marcellino et al., 2008). Interesantemente se ha mostrado que el receptor D3 colocaliza con el receptor D1 en NE y NAc, sugiriendo que la regulación de la función de las NEM puede ser controlada por la acción integrada de ambos receptores (Schwartz et al., 1998). También se ha mostrado que el receptor D3 favorece la vía de señalización del receptor D1 a nivel de la liberación de neurotransmisor y actividad motora (Marcellino et al., 2008; Avalos 2013). Además, algunos autores sugieren la participación del receptor D3 en la regulación de la liberación y síntesis de dopamina, complementando la función de autoreceptor del receptor D2 (De Mei 2009, Shippenberg 2002, Sibley 1999, Joseph 2002). Finalmente, existe evidencia creciente de que el receptor D3 está implicado en procesos neurotróficos, neuroprotectores y neurorestauradores en células dopaminérgicas. Lo cual sugiere que el receptor D3 podría jugar un rol importante en el desarrollo y la prevención de alteraciones que pueden llevar a la neurodegeneración, particularmente en la EP (Collo et al., 2008; Du et al., 2005; Van Kampen and Eckman, 2006).

Por lo tanto, dada su localización e importancia funcional, el receptor D3 podría representar un blanco potencial para el desarrollo de nuevas terapias en los desórdenes del movimiento y/o la prevención de la neurodegeneración.

1.3.2.2.3 Receptor D4

El gen que codifica para el receptor D4 contiene cuatro exones y esta característica se conserva entre humano, rata y ratón. Dicho gen contiene un gran número de polimorfismos en su secuencia localizado en el exón 3 en la región que codifica para su tercera asa intracelular. El polimorfismo consiste de un número variable de repeticiones en tándem de 48 pares de bases cada una (de 2 a 11), por lo cual existen variantes del receptor denominadas de D4.2 a D4.11 en el caso de los humanos. Con respecto a la abundancia de dichas especies, se ha encontrado el receptor D4.4 con una frecuencia de 60%, D4.7 con 14% y D4.2 con 10% (Seemen 1994).

El receptor presenta una homología en las hélices transmembranales de 52% en comparación con el receptor D2. Aunque el perfil farmacológico del receptor D4 es muy parecido al de los otros receptores D2-like, ha podido ser distinguido. Una característica importante de este receptor es su alta afinidad por la clozapina, antagonista D4 y neuroléptico muy utilizado en la clínica (Seeman and Van Tol, 1994). Los agonistas D4 más utilizados son WAY-100365 y PD-168077 con 500 veces mayor afinidad por D4 que por D2 ó D3 (Chemel *et al.*, 2006; Glase *et al.*, 1997). El antagonista L-745,870 es actualmente el fármaco con mejor perfil farmacocinético y más selectivo con 1000 veces más afinidad por el receptor D4 en comparación al D2 y D3 (Patel *et al.*, 1997).

La activación de los receptores D4 produce la inhibición de la adenilato ciclasa a través de proteínas $G_{\alpha i/o}$; disminución de la entrada de calcio a la neurona a través de la inhibición de canales L, N y P/Q mediante $\beta\gamma$, llevando a una menor liberación de neurotransmisor (Page *et al.*, 1998); activación de canales rectificadores de entrada de potasio; y la liberación de ácido araquidónico (Graziane 2009). La vía de señalización de los receptores D4 también promueve la activación de las vías ERK1/2 (Yuen 2000).

El receptor D4 se ha encontrado en el sistema nervioso central en corteza prefrontal, amígdala, hipocampo, GPe, tálamo y SNr (Missale *et al.*, 1998). La expresión selectiva de este receptor en soma y terminales del GPe dirigidas hacia el NST y SNr ha permitido sugerir que está involucrado en la regulación de la actividad del mencionado núcleo y por lo tanto en la modulación de la actividad motora a través de la vía indirecta de los ganglios basales. Se ha demostrado también, que los receptores D4 localizados en las terminales cortico-estriatales modulan la liberación de glutamato (Mrzljak *et al.*, 1996; Ariano *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 1998; González *et al.*, 2012). La función del receptor D4 también ha sido descrita en los GB en sistemas *in vitro*, al activar dicho receptor este inhibe la liberación de GABA a nivel de las terminales pálido-nigrales y pálido-talámicas (Acosta-García *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 1990; Rivera *et al.*, 2003).

1.4 Neurotransmisión de la sustancia nigra reticulata

Las neuronas GABAérgicas de la SNr reciben aferencias del NE, GPe y NST, las cuales transmiten información crítica para la cognición, recompensa, memoria, aprendizaje (Graybiel and Smith, 2014; Hikosaka *et al.*, 2014) y de manera determinante modulan la actividad motora (Robertson, 1992). Claramente, las mencionadas aferencias afectan la actividad neuronal de la SNr; sin embargo, existen más reguladores neuroquímicos como la serotonina (5-HT), endocannabinoides y acetil colina. Si bien, cada núcleo de los GB está estructurado y funciona gracias a innumerables elementos, la neurotransmisión en la SNr representa un grado alto de complejidad y es crucial en la fisiología y fisiopatología del movimiento (Figura 10). A continuación, se describirán los tres neurotransmisores más influyentes en la actividad de la SNr, así como la participación de los diversos receptores dopaminérgicos en la liberación de los mismos.

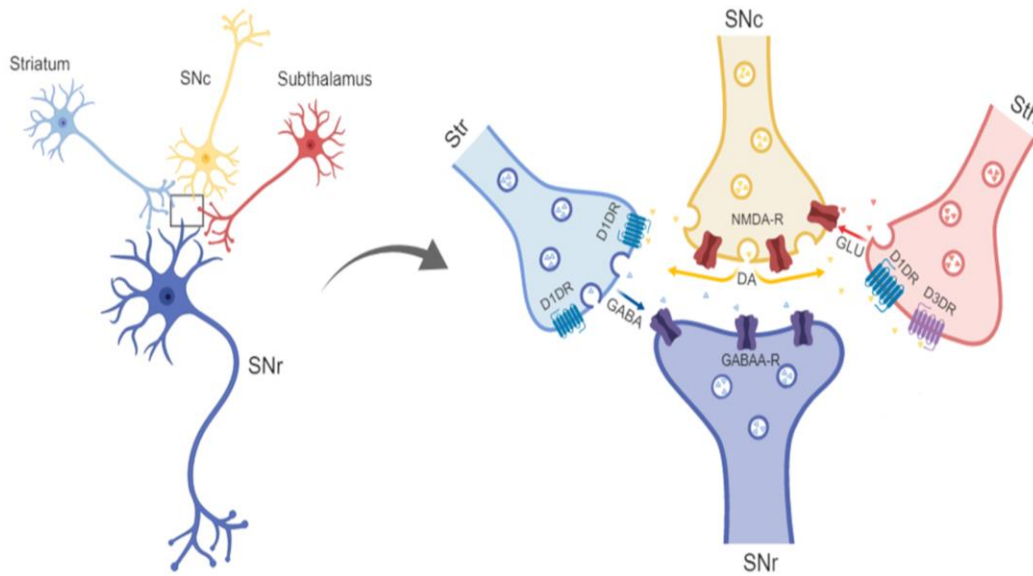


Figura 10. Aferencias GABAérgicas, Dopaminérgicas y Glutamatérgicas de la SNr.

1.4.1 GABA

La entrada GABAérgica estriado-nigral ha sido ampliamente estudiada y establecida como la más importante y prominente de la SNr. Estudios moleculares y de inmunohistoquímica han demostrado que el receptor a dopamina D1 se expresa selectivamente en estas proyecciones (Figura 11) (Gerfen *et al.*, 1990). En ese sentido, mediante técnicas de optogenética se ha comprobado que la activación de neuronas estriatales que expresan a dicho receptor inhibe el disparo espontáneo de la SNr, mientras que la activación de neuronas estriatales que expresan al receptor D2 tiene el efecto opuesto sobre la misma (Friend and Kravitz, 2014). En línea con estos hallazgos, registros electrofisiológicos en animales intactos sugieren que las proyecciones estriado-nigrales inhiben la actividad de las neuronas de la SNr (Hikosaka *et al.*, 2000) y que este efecto se debe a la activación de receptores GABA_A presentes en neuronas nigrales (Windels and Kiyatkin, 2004).

(A) Intense D1R expression in the striatonigral pathway

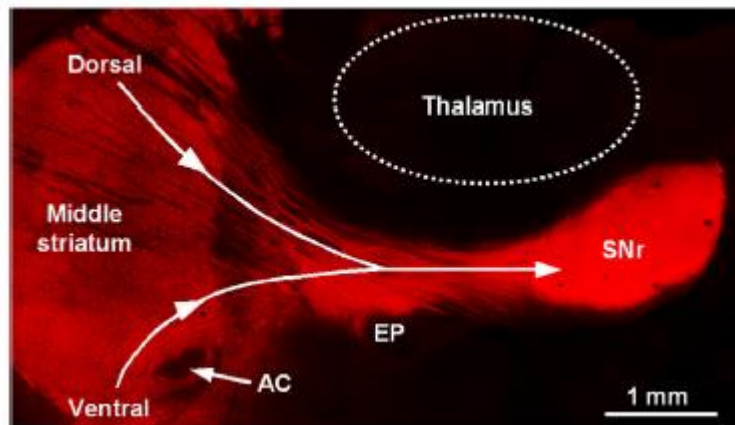


Figura 11. Inmunofluorescencia para el receptor D1. Alta expresión del receptor D1 en la proyección estriado-nigral.

De igual manera, se ha mostrado la expresión de receptores CB1 en las terminales estriado-nigrales a través de estudios inmunohistoquímicos (Kano et al., 2009; Katona and Freund, 2012). Debido a que dicho receptor activa proteínas $G_{i/o}$, su activación provoca la inhibición de canales de calcio ligados a voltaje que posteriormente lleva a una disminución de la liberación de neurotransmisor, en este caso GABA. Consistente con lo anterior, se ha demostrado una disminución en la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) en las neuronas de la SNr en experimentos de electrofisiología donde se ha activado a los receptores CB1 (Wallmichrath and Szabo, 2002). En contraste, los antagonistas CB1 producen un incremento en la amplitud de IPSCs en la SNr, sugiriendo una modulación presináptica y tónica por parte de los cannabinoides endógenos sobre la entrada GABAérgica (Yanovsky et al., 2003).

Las proyecciones pálido-nigrales representan la segunda entrada GABAérgica más importante de la SNr (Smith and Bolam, 1989, 1991) y a diferencia de la entrada estriado-nigral, las sinapsis que forman son grandes, simétricas y se localizan preferencialmente en el cuerpo celular y dendritas proximales formando sinapsis perisomáticas. Dicha característica indica una influencia importante sobre las neuronas nigrales que se ha logrado comprobar a través de la activación específica de las fibras pálido-nigrales (Connelly et al. 2010) aumentando la amplitud de IPSCs en la SNr. A diferencia de la

proyección estriado-nigral que puede inhibir fuertemente la actividad de la SNr cuando es activada por el glutamato cortical y talámico (Smith et al., 2014), la proyección pálido-nigral mantiene una inhibición tónica sobre la SNr debido al disparo de alta frecuencia que caracteriza a las neuronas del GPe. La actividad de las terminales pálido-nigrales es fuertemente influenciada por dopamina, a través de los receptores D4, cuya activación disminuye la salida de GABA y la actividad motora.

Por otra parte, algunos estudios han mostrado la gran importancia de la SNr en la función motora, a través de la aplicación local de agonistas GABA_A. Por ejemplo, la infusión de muscimol o 4,5,6,7-terahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-l hydrochloride (THIP) produce hiperactividad motora y giro contralateral (Jackson and Kelly, 1984; Scheel-Krueger et al., 1979, 1980). Interesantemente, estos efectos fueron revertidos por una lesión con ácido kaínico de la SNr (Kilpatrick et al., 1980). En contraste, la infusión local de antagonistas GABA en una región específica de la SNr produjo inhibición motora, expresada como ascinesia y giro ipsilateral (Arnt y Scheel-Krueger, 1980; Cools et al., 1983; Cools et al., 1984; Di Chiara et al., 1981). Tomando en cuenta los datos anteriores es de resaltar la importancia que tiene la modulación GABAérgica sobre estas neuronas en específico, ya que tienen influencia sobre la actividad motora.

1.4.2 Glutamato

La SNr cuenta con proyecciones glutamatérgicas bien caracterizadas provenientes del NST (Ammari et al., 2010). Los axones subtalámicos forman sinapsis asimétricas en dendritas proximales y distales de las neuronas de proyección de la SNr que interesantemente convergen en las mismas neuronas a las que proyecta el NE (Sato et al., 2000; Bevan et al., 1994). De igual manera, se ha observado que estas proyecciones muy raramente están en contacto con cuerpos celulares.

En roedores, la proyección del NST a la SNr se origina del núcleo completo, enviando además proyecciones colaterales al GPe de la mayoría de sus neuronas (Deniau et al., 1978 a,b; Van Der Kooy and Hattori, 1980; Rinvik and Ottersen, 1993). Recientemente se ha establecido que la activación de las neuronas del NST induce corrientes post-sinápticas

excitatorias (EPSCs) en neuronas de la SNr (Ding et al., 2013). Además, algunos estudios en modelos experimentales de EP han indicado que existe un disparo oscilatorio irregular en las neuronas del NST que afecta la actividad de la SNr (Walters et al., 2007), la cual puede ser normalizada por la lesión del NST (Tseng et al., 2001). Estos hallazgos demuestran la importancia de la inervación subtalámica sobre las neuronas GABAérgicas nigrales.

Entre los receptores que se expresan en las terminales subtalamo-nigrales se encuentran los receptores D1, que al ser activados con el agonista SKF38393 producen un incremento en las EPSCs en neuronas de la SNr. Mientras que la activación de los receptores tipo D2-like –también presentes en estas terminales– con Quinpirole, tiene el efecto opuesto (Ibanez-Sandoval et al., 2006) (Figura 12). Hoy en día no es completamente clara la función fisiológica de ambos tipos de receptores dado que tienen efectos opuestos; sin embargo, se ha especulado que debido a la diferencia en la afinidad que tienen por la dopamina podrían funcionar en base a la disponibilidad de la misma, resultando en una activación diferencial del NST.

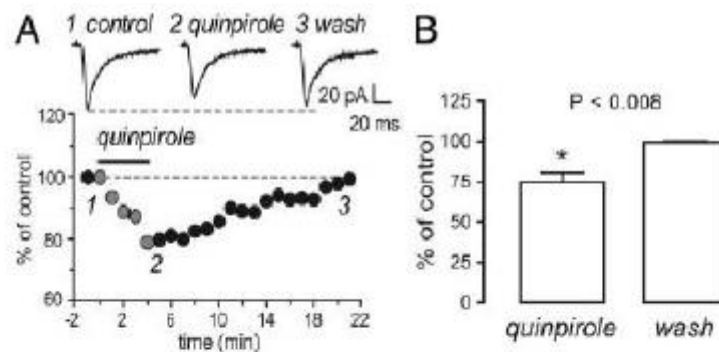


Figura 12. La activación de los receptores tipo D2 disminuye las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) subtalamo-nigrales.

Los efectos del glutamato sobre las células de la SNr son mediados por los receptores AMPA/Kainato, NMDA y receptores metabotrópicos (Marino et al., 2002; Hedberg et al., 2003; Hubert and Smith, 2004). De manera particular, se ha demostrado que la SNr expresa los receptores GluR1, GluR2, GluR2/3, GluR4, NMDAR1 and NMDAR2A/B y las subunidades de los receptores mGluR1 y mGluR2. Es oportuno destacar que, aunque

existe una amplia variedad de receptores a Glutamato expresados en la SNr, la contribución específica de los mismos no ha sido claramente delineada. Interesantemente, el rol de las aferentes subtalámicas y su regulación por glutamato ha sido estudiado en modelos experimentales de Parkinson. En primer término, algunos ensayos han mostrado que la aplicación de agonistas glutamatérgicos produce acinesia severa, que se revierte con los antagonistas respectivos. Por otro lado, en primates tratados con MPTP y ratas pretratadas con reserpina se ha observado un incremento en la actividad de las neuronas de la SNr. Es probable que dicho efecto sea mediado por un incremento de la actividad de las aferentes subtalamo-nigrales, lo cual ha sido ampliamente respaldado por experimentos electrofisiológicos (Robledo and Feager, 1990).

1.4.3 Dopamina

Como se muestra en la Figura 2, existe una inervación importante de dopamina de la SNc hacia la SNr. Diversos enfoques experimentales han permitido determinar que la dopamina puede ser liberada del soma y dendritas de la SNc a través de exocitosis vesicular (Ford et al., 2010; Rice et al., 2011). Esta liberación somatodendrítica puede ser desencadenada por influjo de calcio producido por potenciales de acción, oscilaciones de calcio provocadas por actividad neuronal tipo marcapasos o bien por incrementos de calcio proveniente de almacenes intracelulares (Ford et al., 2010; Chan et al., 2007; Patel et al., 2009). Es importante mencionar que estas neuronas nigrales cuentan con autorreceptores D2 que por su acople a proteínas $G_{i/o}$ producen disminución de la liberación de neurotransmisores, en este caso, de dopamina (Pucak and Grace, 1994).

La gran cantidad de proyecciones dopaminérgicas en la SNr y la presencia de receptores a dopamina en las terminales de mayor influencia en dicho núcleo (estriado-nigrales, palido-nigrales y subtalamo-nigrales), revelan la importancia de la modulación dopaminérgica en la neurotransmisión de este núcleo de salida. Existe evidencia de que cada uno de estos receptores modula la liberación del neurotransmisor de la neurona en la que se

encuentra; sin embargo, la función de algunos elementos en el complejo de salida no ha sido dilucidada. Si bien cada neurotransmisor tiene una función definida al activar sus receptores respectivos; el incremento o disminución de la liberación de alguno de estos neurotransmisores podría influenciar la actividad neuronal colindante. Es por ello que la ausencia de la dopamina genera cambios tan drásticos en la interacción de neurotransmisores durante la EP.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Interacción entre los neurotransmisores dopamina, glutamato y GABA en la sustancia nigra pars reticulata

Por varios años se ha estudiado el efecto final de cada neurotransmisor sobre la actividad de las neuronas de la SNr; por ejemplo, se ha obtenido evidencia de la interacción presináptica y postsináptica de la dopamina y el glutamato en algunas regiones de los GB y la influencia de los mismos en algunas funciones motoras y de aprendizaje. (Riederer *et al.*, 1992). Con respecto a esto, se han encontrado fibras corticales y subtalámicas que se comunican directamente con el soma y dendritas de la SNc (Smith *et al.*, 1996). De igual manera, algunos ensayos *in vitro* de la SNr, han revelado que agonistas específicos e inespecíficos de los receptores NMDA estimulan la liberación de dopamina tritiada de manera dependiente de calcio. Por otra parte, en estudios de microdiálisis *in vivo* se demostró que la estimulación del núcleo subtalámico con carbacol (agonista colinérgico) produce un incremento en los niveles de dopamina, glutamato y GABA en la SNr (Rosales *et al.*, 1997). En ese trabajo, Rosales *et al.*, 1997 demostraron que dichos neurotransmisores tienen una interacción recíproca, ya que la activación de receptores NMDA de las dendritas de la SNc produce un aumento de dopamina, dicha dopamina incrementa la liberación de GABA y glutamato mediante activación de receptores D1 de las aferentes estriado-nigrales y subtálamo-nigrales, respectivamente, promoviendo así un circuito repetitivo de liberación de neurotransmisores. Dado que el receptor D3 se encuentra modulando la liberación de glutamato de las terminales subtálamo-nigrales, es

de vital importancia describir su papel en condiciones fisiológicas y de Parkinson experimental.

Por otra parte, la modulación de la neurotransmisión GABAérgica en la SNr mediada por la dopamina es evidenciada por su abundante presencia y liberación dendrítica sobre este núcleo neuronal. En concordancia con lo anterior, a través de estudios iontoforéticos se ha comprobado que la dopamina puede inducir la actividad de las neuronas de la SNr en animales intactos (Ruffieux and Schultz 1980; Waszczak and Walters 1983).

Los anteriores son ejemplos generales de la influencia de un neurotransmisor sobre la liberación de otro. La proximidad de sinapsis de diferente naturaleza en la SNr, sumado a que las aferentes nigrales cuentan con receptores dopaminérgicos, GABAérgicos y glutamatérgicos forman un microambiente donde cada proceso de liberación de un neurotransmisor puede influenciar otro proceso próximo, de ahí la importancia de la interacción de neurotransmisores en este núcleo de salida.

2.2 Participación del receptor D3 en la neurotransmisión de la SNr y la conducta motora

Las neuronas del NST expresan en sus terminales a los receptores a dopamina D1-like, D2 y D3 (Diaz *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 1999) (Fig. 13). Cabe mencionar que los receptores D3 se han encontrado en soma y terminales de dichas neuronas.

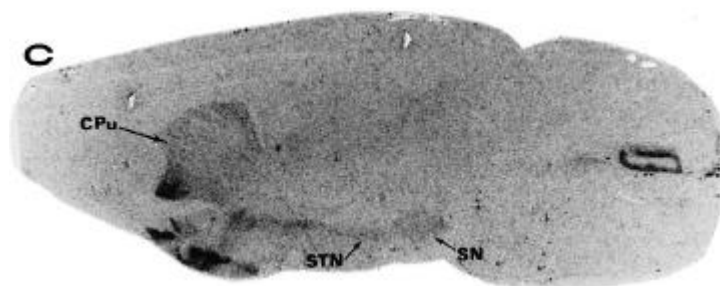


Figura 13. Autorradiografía del receptor D3 en un corte sagital que muestra el NST del cerebro de rata, utilizando (H3)7-OH-DPAT como marcador (Flores *et al.* 1999).

En cuanto a la función de los receptores tipo D3, se ha comprobado que la aplicación del agonista no selectivo D2/D3 Quinpirole en experimentos electrofisiológicos produce una disminución de las EPSCs en la SNr. Adicionalmente, se comprobó la localización presináptica de este receptor mediante el protocolo de pulsos pareados (Ibañez-Sandoval *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere la modulación dopaminérgica de las terminales subtálamo-nigrales a través del receptor D3.

Con respecto a la función del receptor D3 en la conducta motora, varios reportes han descrito que la activación de dicho receptor, a través de la administración sistémica de sus agonistas farmacológicos, disminuye la actividad motora y que la aplicación sistémica de sus antagonistas la incrementan (Figura 14) (Waters *et al.*, 1993; Clifford *et al.*, 1998; Car *et al.*, 2002; Cote *et al.*, 2014).

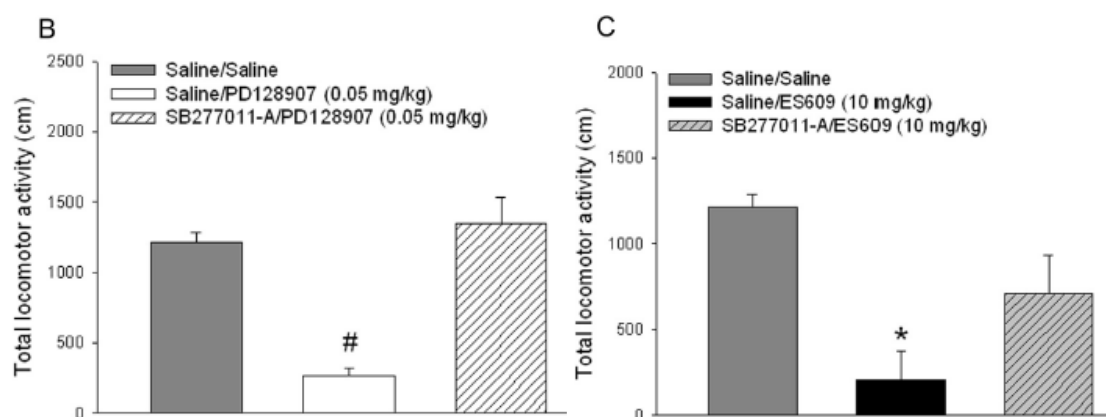


Figura 14. Efecto del agonista D3 PD128907 y de su antagonista SB277011-A sobre la actividad locomotora.

Debido a que las neuronas nigro-talámicas controlan el flujo de información hacia la corteza a través del tálamo, la activación del receptor D3 en la SNr podría estar desempeñando un rol importante en la modulación de la conducta motora en condiciones fisiológicas. De igual manera, hoy en día se utilizan algunos agonistas D3 para el tratamiento de la EP; sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido completamente esclarecido (Marek *et al.*, 2013).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque se ha mostrado a través de herramientas farmacológicas *in vitro* que el receptor D3 modula la liberación de glutamato hacia la SNr, su participación en la conducta motora no ha sido definida concretamente. Es importante correlacionar los efectos del bloqueo farmacológico del receptor D3 con la conducta motora en animales, para así proponer un mecanismo de su participación en la neurotransmisión en la SNr. Así mismo, hay poca información disponible acerca del mecanismo de acción de la L-Dopa durante el tratamiento de la EP. Por lo tanto, es de interés en este trabajo describir un mecanismo por el cual dicho fármaco promueve la recuperación motora en animales con Parkinson experimental y como el receptor D3 nigral participa en el mismo, a través de una correlación entre los cambios neuroquímicos y la conducta motora de ratas en libre movimiento.

4. JUSTIFICACIÓN

- Dado el creciente interés en el receptor D3 como blanco terapéutico en la enfermedad de Parkinson, es esencial describir la correlación entre la función de dicho receptor en la interacción dopamina/GABA/glutamato nigral y las modificaciones de la conducta motora que se presentan en condiciones fisiológicas y de Parkinson experimental.
- Es de gran relevancia entender los mecanismos por los cuales actúa la L-Dopa, el fármaco de elección para la enfermedad de Parkinson y como participa el receptor D3 en este tratamiento, así como sus efectos sobre la conducta motora.

5. HIPOTESIS

-El bloqueo del receptor D3 intranigral, reproduce los efectos del bloqueo sistémico del mismo, incrementando la actividad motora en ratas normales.

-La L-Dopa activa los receptores D3 en la denervación dopaminérgica modulando la liberación de GABA y glutamato restaurando la actividad motora.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar la participación de los receptores dopaminérgicos D3 en la interacción recíproca dopamina/GABA/glutamato en la sustancia nigra reticulada sobre la actividad motora en condiciones normales y de Parkinson experimental.

6.2 Objetivos Específicos

1.-Estudiar el efecto del bloqueo de los receptores D3 que participan en la interacción recíproca dopamina/GABA/glutamato sobre la actividad motora en ratas normales.

2.-Caracterizar el efecto del bloqueo de los receptores D3 de la SNr sobre la liberación de GABA y glutamato durante la denervación dopaminérgica de la rata, así como su efecto sobre la actividad motora.

3.-Evaluar la participación de los receptores D3 en la acción de la L-Dopa en la SNr y su efecto sobre la actividad motora durante la denervación dopaminérgica.

4.- Proponer un nuevo modelo de interacción de estos neurotransmisores en la sustancia nigra reticulada de ratas normales y su activación por la L-Dopa en condiciones de Parkinson experimental.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales de experimentación

Para los procedimientos experimentales se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 170-190 y 220-240 g. Los animales se mantuvieron en condiciones de habituación de bioterio: temperatura ambiente de 18-23 °C, en ciclo de luz-obscuridad de 12/12 horas y alimentación *ad libitum*.

7.2 Lesión con 6-OHDA

Los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina (75 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y colocados en un aparato estereotáxico (*David Kopf Instruments, Tujunga, CA*). Posteriormente se realizó la inyección unilateral intracerebral de 1 µl de 6-OHDA (16 µg/µl disuelta en solución salina 0.9% y ácido ascórbico 0.1%) en el haz del cerebro medio, cuyas coordenadas fueron obtenidas del atlas de Paxinos y Watson (1998). Anteroposterior: -1.8 mm Lateral: -2.4 mm y Dorsoventral: -7.0 mm. Al terminar cada cirugía las ratas fueron administradas vía s.c. con enrofloxacin 5 mg/Kg de peso, con la finalidad de prevenir infecciones.

7.3 Conducta de Giro

Después de 8 días de realizada la lesión con 6-OHDA, se llevó a cabo la prueba conductual de giro para corroborar el grado de lesión de las ratas. Para cumplir con este propósito se contabilizaron los giros inducidos por una inyección intraperitoneal de anfetamina (8 mg/Kg). Los animales que presentaron al menos 8 giros ipsilaterales por minuto durante una hora fueron considerados como aptos para la implantación de la cánula guía en la SNr y el experimento de microdiálisis correspondiente.

7.4 Implantación de Cánula guía

Para llevar a cabo los experimentos de microdiálisis, los animales (ratas normales y hemiparkinsonianas de entre 220-240 g de peso) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina vía i.p. (75 mg/kg / 5 mg/kg) y colocados en el estereotáxico (*David Kopf Instruments, Tujunga, CA*) donde se les implantó una cánula guía plástica en las coordenadas: Anteroposterior: -8.9 mm, Lateral -1.9 mm, Dorsoventral: -7.0 mm, con respecto a bregma y una inclinación de 43 grados con respecto al plano horizontal; correspondientes a la SNr (Figura 14) (Paxinos y Watson, 1998).

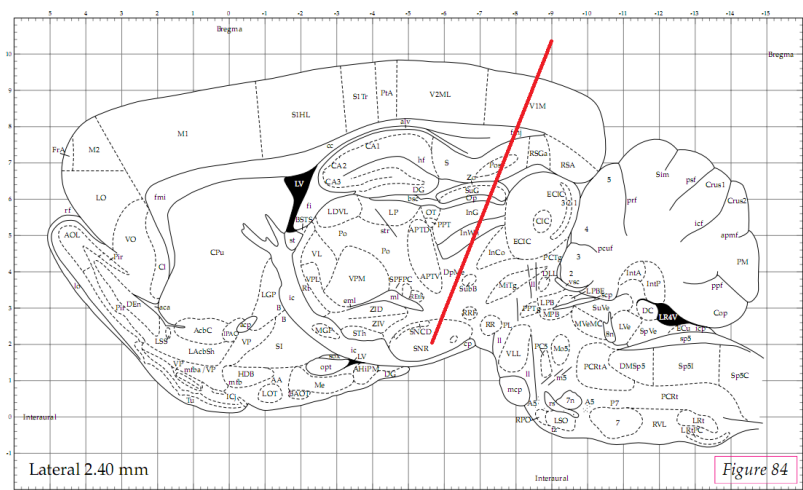


Figura 14. Localización de la SNr según el atlas de Paxinos y Watson.

7.5 Experimentos de Microdiálisis

Los experimentos de microdiálisis se llevaron a cabo de 3 a 5 días después de la implantación de la cánula guía. Los animales se colocaron en una caja de actividad motora (*med associates inc*) y se aseguraron con un cinturón a la altura del tórax, lo que les permitió moverse libremente. Posteriormente se les insertó una sonda de diálisis concéntrica de 240 μm de diámetro en la cánula guía previamente implantada. Dicha sonda cuenta con una punta de 1 mm, volumen interno de 1 μl y membrana de exclusión molecular de 6000 Da (*CMA/11. CMA Microdialysis AB*) (Figura 15).

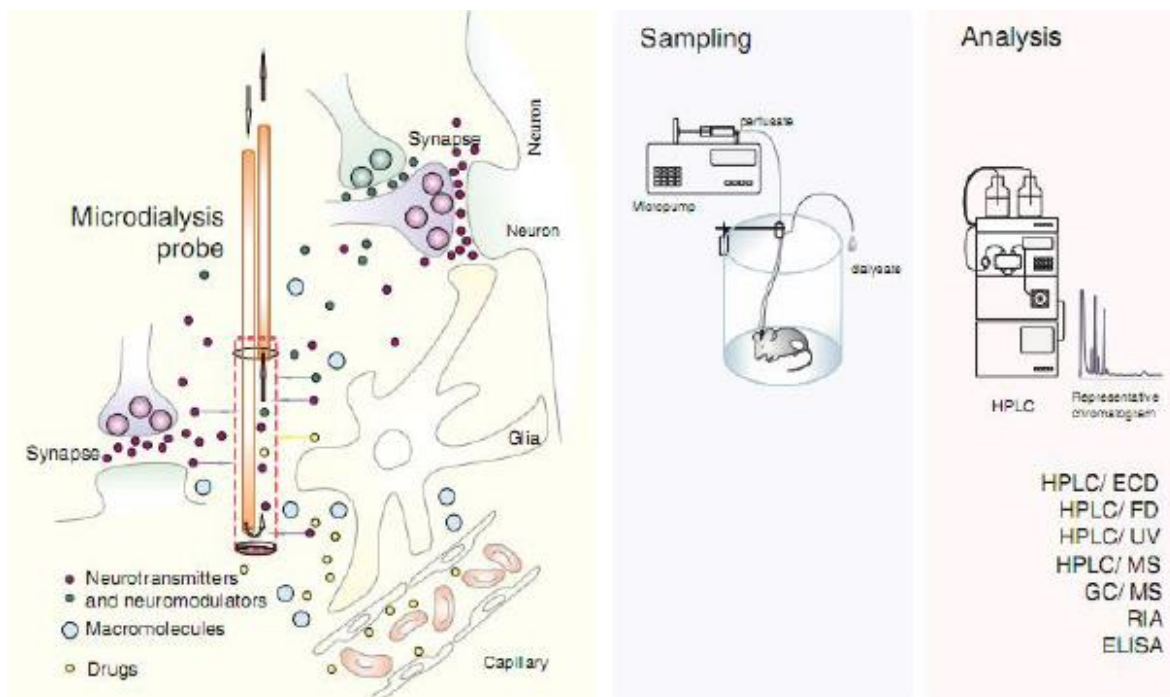


Figura 15. Esquema general del proceso de microdiálisis. En el panel izquierdo se muestra el intercambio de la membrana semipermeable que se lleva a cabo en el tejido cerebral. Al centro se muestra el proceso de muestreo y a la derecha la detección de las moléculas de interés mediante HPLC. (Tomado de Anderzhanova and Wotjak, 2013.)

Se perfundió solución Ringer (3 μ l por minuto) a través de la cánula durante dos horas. Tras este periodo de estabilización, se obtuvieron dializados de 60 μ l cada 20 minutos. La administración de los fármacos se realizó ya sea a través de la cánula (disueltos en la solución de perfusión), o bien por vía intraperitoneal.

7.5 Actividad Motora

Los parámetros motores a evaluar en este estudio fueron: Distancia ambulatoria, cuentas no ambulatorias y giros, que fueron determinados a través de una caja de actividad motora (*Activity Test Chamber ENV-515s*) y obtenidos mediante el programa "Activity Monitor" (*Med Associates Inc*).

7.6 Cuantificación de Dopamina por HPLC

25 μ l de cada dializado obtenido del experimento se inyectaron directamente en un cromatógrafo de Fluorescencia Waters (*2475 Multi λ Fluorescence Detector, Waters Inc*), mediante un inyector manual Rheodyne con un asa de 20 μ L. El cromatógrafo se programó a una longitud de onda de excitación de λ_{ex} =279 nm y una longitud de emisión de λ_{em} =320 nm; además de una ganancia de intensidad de mil (Gain=1000).

La separación cromatográfica se realizó mediante una columna Ascentis Express C18, tamaño de partícula 2.7 μ m, 4.6 mm de ancho y 100 mm de largo de la marca SUPELCO Analytical (*Sigma-Aldrich Co*). Los componentes de la fase móvil utilizada fueron: ácido monocloroacético (9.48 mg/l), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (189 mg/L, ácido), ácido 1-octanesulfónico (166 mg/L). Se utilizó una concentración final de 4.5% de acetonitrilo y se ajustó el pH a 3.2 con NaOH (Rosales *et al.*, 1997). La bomba utilizada para este sistema fue una HPLC BAS PM-80 que se programó a un flujo de 0.6 ml/min.

7.7 Cuantificación de GABA y glutamato por HPLC

35 μ l de cada dializado obtenido del experimento se sometieron a una reacción de derivatización con 5 μ l de la solución: (2.7 mg OPA, 10% metanol, 0.5 μ L de 2- β -mercaptoethanol (99%), y 9 ml 0.1 M Buffer de tetraborato de sodio), dicha mezcla se agitó por 2 minutos en vortex y se inyectó en un cromatógrafo Antec Leyden Intro LC-EC mediante un inyector manual Rheodyne. Para la detección electroquímica se utilizó un potencial de celda de +0.550 mV, un filtro digital de 1 s para reducir el ruido de la señal y se ajustó el equipo a una temperatura de 35 ± 2 °C aproximadamente.

La cromatografía se realizó mediante una columna para HPLC Ascentis Express C18, tamaño de partícula 2.7 μ m, 4.6 mm de ancho y 100 mm de largo de la marca SUPELCO Analytical (*Sigma-Aldrich Co*). Los componentes de la fase móvil utilizada fueron: fosfato disódico (35.814 g/L), metanol 30% y acetonitrilo 3.5%, el pH fue ajustado con ácido fosfórico a 6.7 (Quiroz-Gonzalez *et al.*, 2013). La bomba de flujo utilizada fue una HPLC Waters 515 (*Waters Inc*) que se ajustó a un flujo de 0.9 ml/min.

7.8 Histología

Al terminar cada experimento de microdialisis, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilacina (75 mg/kg de peso, de ketamina; 5 mg/kg de peso, de xilacina, vía i.p.) y decapitados. Posteriormente se realizó la extracción del cerebro, que se colocó en una solución de Formol al 4% por al menos 24 horas. Una vez fijado el cerebro, se realizaron rebanadas sagitales de 300 μm de grosor, en un vibratómo WPI (World Precision Instruments). Las rebanas de cerebro fueron observadas de manera detallada con ayuda de un microscopio de luz blanca, con el objetivo de 2X. Para cada experimento se confirmó la correcta posición de la sonda de la cánula de microdialisis en la SNr.

7.9 Análisis Estadístico

Para cada uno de los neurotransmisores analizados, los datos fueron expresados como porcentaje de neurotransmisor medido en el dializado "X" con respecto al control (valor basal del dializado 1). En relación a la actividad locomotora, se obtuvieron los datos de distancia ambulatoria (cm), giro (número de giros/min) y actividad no ambulatoria (cuentas), los cuales fueron graficados con respecto al número de dializado. Para evaluar los efectos de diferentes fármacos dentro de las mismas condiciones experimentales, todos los datos fueron evaluados por medio de análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido por una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. Para comparar los efectos de los fármacos en dializados de diferentes sets de experimentos se utilizó una prueba *t* no pareada. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas por medio del software GraphPad prisma versión 7.03 (*GraphPad Software, Inc*).

8. RESULTADOS

8.1 El bloqueo del receptor D3 incrementa la concentración de glutamato, dopamina y GABA en la SNr de ratas en libre movimiento

Para investigar el papel del receptor D3 en la modulación de la liberación de glutamato, dopamina y GABA *in vivo*, se perfundi6 el antagonista altamente selectivo GR 103691 (100 nM i.c.) en la SNr de ratas en libre movimiento (Audinot et al., 1998). En la Figura 16 se muestra el resultado de la microdiálisis acoplada a la medici6n de la conducta motora despu6s del bloqueo del receptor D3. Como se puede apreciar en la figura 16A, la perfusi6n de GR 103691 produjo un incremento significativo glutamato del dializado cuatro al seis, el cual regres6 gradualmente al valor basal en el dializado siete. El incremento m6ximo de glutamato fue observado durante el dializado cuatro, el cual fue de $239\pm 21\%$ en comparaci6n con el dializado tres $102\pm 3\%$ ($p < 0.001$). De manera similar, se observaron incrementos en las concentraciones de dopamina y GABA en el mismo curso temporal. En el caso de la dopamina el incremento m6ximo en el dializado 4 fue $202\pm 8\%$ en comparaci6n con el dializado tres $99\pm 2\%$ (Figura 16B; $p < 0.001$). Mientras que en el caso de GABA el m6ximo incremento en el dializado cuatro fue $170\pm 5\%$ en comparaci6n con el dializado tres $100\pm 2\%$ (Figura 16C; $p < 0.001$).

De manera simult6nea a la microdiálisis se evaluaron dos par6metros de actividad locomotora (distancia ambulatoria y cuentas no-ambulatorias) y uno de asimetría locomotora (giros contralaterales). En todos los casos se observaron incrementos estadísticamente significativos que correlacionaron con los cambios en los niveles de glutamato, GABA y dopamina con similares cursos temporales. En primer lugar, la distancia ambulatoria m6xima alcanzada en el dializado cuatro fue de 209 ± 20 cm, comparado con el dializado tres 23 ± 13 cm (Figura 16D; $p < 0.001$). De igual manera, las cuentas no-ambulatorias m6ximas en el dializado cuatro fueron 982 ± 35 comparadas con el dializado tres 250 ± 30 (Figura 16E; $p < 0.001$). Finalmente, los giros contralaterales m6ximos registrados en el dializado cuatro fueron 1.25 ± 0.25 giros, comparados con el dializado tres 0.12 ± 0.12 (Figura 16F; $p < 0.001$).

8.2 Efectos del bloqueo del receptor D3 dependientes del receptor D1 sobre la liberación de GABA y Glutamato

Previamente, en experimentos similares de microdiálisis, Rosales et al. (1997) mostraron que la estimulación del núcleo subtalámico produce un incremento en los niveles de GABA y glutamato en la SNr de la rata. Este incremento fue mediado por la liberación de glutamato, el cual al activar receptores NMDA en las dendritas dopaminérgicas promovió la liberación de dopamina, la cual habría activado receptores D1 en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, estimulando la liberación de los neurotransmisores.

Por lo tanto, se exploró si los incrementos de GABA y glutamato observados durante el bloqueo del receptor D3 son consecuencia de la estimulación del receptor D1 por dopamina endógena liberada por glutamato. Para ello en el grupo experimental se perfundió el antagonista selectivo de receptores D1-like (Neumeyer et al., 2003), el SCH 23390 (1 μ M; dializados 4-9), previo al bloqueo del receptor D3 con GR 103691 (dializados 7-9; Figura 17, círculos rojos). Por otra parte, en el grupo control, las ratas fueron perfundidas con solución salina en lugar de SCH 23390 y con GR 103691 en los dializados siete al nueve. Los resultados se muestran en la misma figura (círculos negros).

Con respecto al grupo experimental, SCH 23390 no modificó por sí mismo de manera significativa los niveles de ninguno de los tres neurotransmisores (Figuras 17A-17C), incluso después de 60 minutos de perfusión (glutamato dializado tres: 98 ± 1 vs dializado seis: 100 ± 2 ; dopamina dializado tres: $99 \pm 1\%$ vs dializado seis: $101 \pm 2\%$; GABA dializado tres: 99 ± 1 vs dializado seis: 96 ± 4). Sin embargo, el bloqueo del receptor D1 produjo varios efectos sobre la liberación de neurotransmisores cuando el receptor D3 fue bloqueado concomitantemente. Primeramente, como se muestra en la Figura 17A, durante el bloqueo combinado de los receptores D1 y D3 se observó una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de glutamato liberado (incremento máximo en el dializado siete con GR 103691: $244 \pm 17\%$ vs dializado siete de GR 103691 + SCH 23390: $153 \pm 5\%$, $p < 0.001$). Por otra parte, la liberación de dopamina no fue modificada por el co-tratamiento con SCH (Figura 17B, máximo incremento en el dializado siete con

GR 103691: $194 \pm 6\%$ vs el dializado siete con GR 103,691 + SCH 23390: $184 \pm 8\%$, ns), mientras que el aumento de GABA liberado fue completamente prevenido (Figura 17C, máximo incremento en el dializado siete con GR 103,691: $172 \pm 6\%$ vs dializado siete con GR 103,691 + SCH 23390: $101 \pm 3\%$, $p < 0.001$). Por otra parte, en el grupo de animales control, el efecto del bloqueo del receptor D3 no fue diferente con respecto a los experimentos presentados en la figura 16, en la cual dicho antagonista fue administrado del dializado cuatro al seis, en la comparación estadística de los dializados correspondientes no se encontraron diferencias significativas.

Finalmente, al evaluar los efectos los tratamientos sobre los parámetros de actividad y asimetría motora, el hallazgo más sorprendente es que el bloqueo del receptor D1 previno los efectos conductuales previamente observados durante el bloqueo del receptor D3 solo (Figuras 17D-17F, círculos rojos comparados con los círculos negros).

8.3 Los incrementos de la liberación de Glutamato y GABA por el bloqueo del receptor D3 dependen de dopamina endógena

Los resultados anteriores indican que la estimulación del receptor D1 media parte del efecto del bloqueo del receptor D3 sobre la liberación de glutamato y el efecto completo sobre la liberación de GABA. Aunado a esto, algunos reportes previos han sugerido que el glutamato puede controlar la liberación de dopamina a través de la activación de receptores NMDA; por lo tanto, se exploró si la dopamina endógena liberada a través de la activación de receptores NMDA por glutamato activa a los receptores D1. Los resultados revelaron que el bloqueo de los receptores NMDA (ácido kinurénico, $500 \mu\text{M}$) no modificó la liberación de glutamato (Figura 18A, dializado tres: $103 \pm 4\%$ vs dializado seis: $109 \pm 4\%$, ns). Sin embargo, el efecto del bloqueo del receptor D3 sobre la liberación de glutamato se mantuvo, (Figura 18A, dializado seis: $109 \pm 4\%$ vs dializado siete: $172 \pm 5\%$, $p < 0.001$), aunque el efecto fue significativamente menor que el observado cuando se bloquea solo al receptor D3 (Figura 17A, dializado siete con GR 103,691: $244 \pm 17\%$ vs Figura 18A, dializado siete GR 103,691 + ácido kinurénico: $172 \pm 4\%$, $p < 0.01$), y muy parecido a lo

observado cuando se bloquean los receptores D1 y D3 (Figura 17A, dializado siete con GR 103691 + SCH 23390: $154 \pm 5\%$ vs Figura 18A, dializado siete GR 103691 + ácido kinurénico: $172 \pm 4\%$, ns).

Por otro lado, como se esperaba, la perfusión con ácido kinurénico previno el incremento de dopamina mediado por el bloqueo del receptor D3 (Figura 18B, dializado seis: $98 \pm 4\%$ vs dializado siete: $100 \pm 3\%$, ns), sin afectar los niveles de neurotransmisor basal (Figura 18B, dializado tres: $102 \pm 2\%$ vs dializado seis $98 \pm 3\%$, ns).

Con respecto a los niveles de GABA, el bloqueo de los receptores NMDA no modificó la liberación basal de GABA (Figura 18C, dializado tres: $100 \pm 3\%$ vs dializado seis: $99 \pm 3\%$, ns); sin embargo, previno el aumento producido por el bloqueo de los receptores D3 (Figura 18C, dializado siete: $95 \pm 1\%$ vs 17C, dializado siete: $172 \pm 6.13\%$; $p=0.005$). Adicionalmente, como se observó con el bloqueo del receptor D1, el bloqueo del receptor NMDA también previno los efectos conductuales de GR 103691 (Figura 18A–C).

Finalmente, se exploró el efecto del bloqueo concomitante del receptor D1 y los receptores NMDA conjuntamente con la administración de GR103691. Como se puede observar en la figura 19, el efecto es muy similar al producido cuando se bloquean los receptores NMDA solos (Figura 18). Se observó un incremento en los niveles de glutamato, pero interesantemente fue significativamente menor al producido cuando se bloqueó únicamente el receptor D3 (Figura 19A, dializado siete: $171 \pm 4\%$, vs 17A, dializado cuatro con GR 103691: $244 \pm 17\%$; $p < 0.001$). Adicionalmente, no se observaron cambios ni en los niveles de dopamina (Figura 19B, dializado seis, $103 \pm 3\%$ vs dializado siete: $100 \pm 4\%$, ns), ni en los niveles de GABA (Figure 19C, dializado seis: $102 \pm 2\%$ vs dializado siete: $97 \pm 4\%$, ns).

Finalmente, de manera similar a lo encontrado con el bloqueo de los receptores NMDA solos, el bloqueo concomitante de receptores NMDA y D1 previno todos los efectos conductuales del GR103691 (Figura 19A–C).

8.4 El bloqueo sistémico del receptor D3 mimetiza el efecto del bloqueo intranigral del receptor D3, papel del receptor D1

Para determinar si los cambios producidos por el bloqueo local del receptor D3 en SNr de rata correlacionan con cambios inducidos por bloqueo sistémico de dichos receptores, se realizaron experimentos de microdialisis acoplados a evaluaciones de actividad motora en ratas administradas intra-peritonealmente con el antagonista de receptor D3 U99194A. Se utilizó U99194A en lugar de GR103691, porque el primero posee mayor capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Los resultados de una sola inyección intraperitoneal de U99194A (25 mg/kg) se muestran en la Figura 20. Sorprendentemente, el U99194A indujo un aumento sustancial en el glutamato nigral (Figura 20A, dializado cuatro: $284 \pm 19\%$ vs dializado tres: $101 \pm 2\%$, $p < 0.001$), el cual regresó a los valores basales en el dializado ocho. Además, el bloqueo sistémico del receptor D3 produjo incrementos en los niveles de dopamina (Figura 20B, dializado cuatro: $245 \pm 13\%$ vs dializado tres: $101 \pm 3\%$, $p < 0.001$) y GABA (Figura 20C, dializado cuatro: $239 \pm 12\%$ vs dializado tres: $103 \pm 3\%$, $p < 0.001$). Como se esperaba, la administración de U99194A aumentó la distancia ambulatoria y las cuentas no ambulatorias, con un curso temporal similar al del aumento de los neurotransmisores (Figuras 16D, distancia máxima ambulatoria en dializado cuatro: 474 ± 69 cm vs distancia ambulatoria basal durante el dializado tres: 61 ± 28 cm, $p < 0,001$; Figura 16E, cuentas no ambulatorias máximas en el dializado cuatro: 1529 ± 347 cuentas vs cuentas no ambulatorias en el dializado tres: 372 ± 43 , $p < 0,001$).

Ya que el bloqueo nigral del receptor D1 previno los efectos conductuales del antagonista D3 cuando se administró localmente, se probó un posible mecanismo intranigral de los efectos del bloqueo sistémico de receptores D3. Con esta finalidad se llevaron a cabo experimentos bloqueando el receptor D1 nigral mediante la perfusión de SCH 23390 en los dializados cuatro a nueve antes de la inyección sistémica de U991194A (durante el dializado seis); los resultados se muestran en la Figura 21. Como se observó previamente (Figura 17), el SCH 23390 no modificó los niveles basales de glutamato, dopamina o GABA; sin embargo, el bloqueo intranigral del receptor D1 disminuyó considerablemente los incrementos de glutamato, dopamina y GABA producidos por la administración sistémica

de U991994 (Figura 20). Para el glutamato (Figura 21A), se observó un incremento significativo en los dializados ocho ($133 \pm 6\%$, $p < 0.001$) y nueve ($142 \pm 7\%$, $p < 0.001$). En el caso de la dopamina (Figura 21B), también se observaron incrementos en los dializados ocho ($124 \pm 11\%$, $p < 0.05$) y nueve ($123 \pm 4\%$, $p < 0.05$). Mientras que en el caso de GABA (Figura 21C), los incrementos fueron los más altos de los tres neurotransmisores en los dializados siete ($142 \pm 10\%$, $p < 0.001$) y ocho ($156 \pm 14\%$, $p < 0.001$).

Los cambios en los niveles de neurotransmisores produjeron cambios bajos, pero significativos en la distancia ambulatoria y cuentas no ambulatorias (Figura 21D, distancia ambulatoria dializado tres: 43 ± 19 cm vs el dializado ocho: 152 ± 26 cm y el dializado nueve: 191 ± 23 cm, $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente; Figura 21E, cuentas no ambulatorias del dializado tres: 200 ± 49 vs el dializado siete: 590 ± 71 y el dializado ocho: 414 ± 93 , $p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente). En la Figura 23 se puede observar la representación gráfica de los registros de actividad locomotora de una rata de cada grupo experimental realizada por el software automatizado. Se puede observar que tanto el bloqueo intranigral del receptor D3 (Figura 16), como el bloqueo sistémico (Figura 20) produjeron un aumento en la actividad locomotora, mientras que el bloqueo del receptor D1 nigral impidió o disminuyó los incrementos de la actividad motora producida por ambas manipulaciones del bloqueo del receptor D3 (Figuras 17 y 21). Finalmente, la Figura 24 muestra una sección sagital representativa del cerebro de la rata y diagramas esquemáticos donde se indica la localización de las pruebas de microdiálisis implantadas en cada condición experimental.

8.5 Efecto del bloqueo sistémico de los receptores D1 y D3 sobre los efectos neuroquímicos y conductuales producidos por la L-Dopa

Para investigar la participación de los receptores D3 en la acción de la L-Dopa en la SNr y su efecto sobre la actividad motora durante la denervación dopaminérgica, se llevaron a cabo experimentos de microdiálisis concomitantemente con evaluaciones de actividad motora en ratas previamente lesionadas con 6-OHD. La administración sistémica de L-

Dopa (10 mg/Kg) produjo un incremento significativo en los niveles de dopamina, GABA y glutamato

La administración de L-Dopa produjo un incremento en la liberación de los tres neurotransmisores. La dopamina es consecuencia de la transformación de L-Dopa, la cual se expresó como incremento con respecto de la concentración promedio que hay en la rata normal (9.6 nM). Para el glutamato (Figura 22A), se observó un incremento máximo significativo en el dializado ocho ($197 \pm 6\%$, $p < 0.001$). En el caso de la dopamina (Figura 22B), también se observaron incrementos en los dializados ocho ($49.8 \pm 6\%$, $p < 0.001$). Estos incrementos se correlacionaron con incrementos en la actividad motora e indujeron conducta de giro. La distancia ambulatoria máxima alcanzada en el dializado ocho fue de 2570 ± 8 cm, comparado con el dializado tres 214 ± 3 cm (Figura 22D; $p < 0.001$). De igual manera, las cuentas no-ambulatorias máximas en el dializado cuatro fueron 4311 ± 55 comparadas con el dializado tres 759 ± 23 (Figura 22E; $p < 0.001$). Finalmente, los giros contralaterales máximos registrados en el dializado cuatro fueron 9.8 ± 0.25 giros, comparados con el dializado tres 0.6 ± 0.15 (Figura 22F; $p < 0.001$).

Para entender el papel de los receptores D3 en la denervación administramos el antagonista selectivo de estos el U 99194 (dosis) previo a la administración de L-Dopa, en la Figura 22, se puede ver que el bloqueo de los receptores D3 incrementa significativamente la liberación de glutamato y GABA sin modificar la dopamina, lo cual correlacionó con incrementos en la actividad locomotora y la conducta de giro. Para ver si el efecto de la actividad de los receptores D3 se relaciona con la actividad de receptores D1 como en la condición normal, agregamos SCH 23390 conjuntamente con el U 99194 previo a la administración de L-Dopa lo que abolió los niveles de glutamato y GABA, pero no de dopamina e inhibiendo la actividad motora.

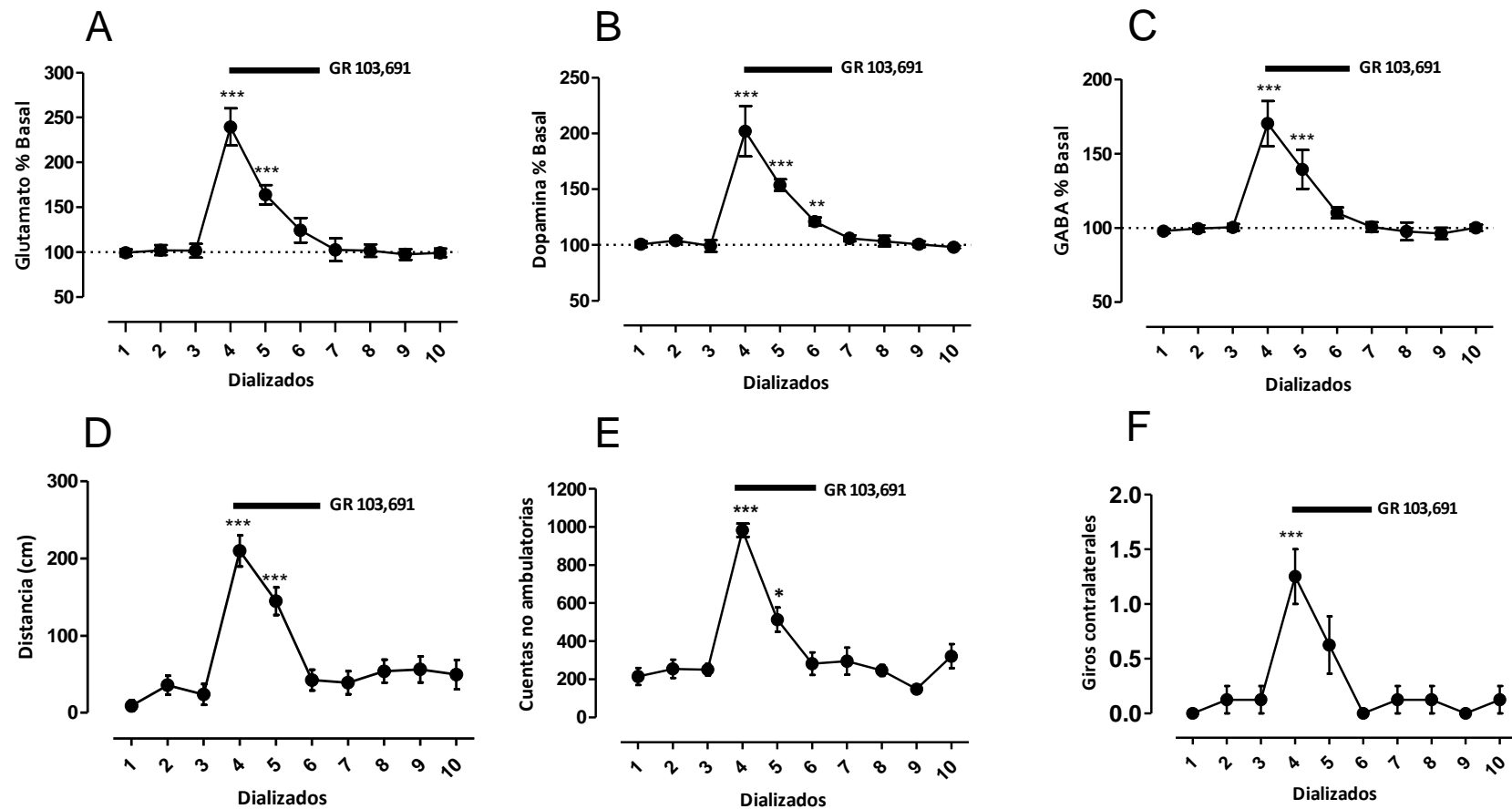


Figura 16. El bloqueo del receptor D3 intranigral incrementa el glutamato, dopamina y GABA intersticiales y estimula la actividad locomotora. A, B y C muestran el porcentaje de cambio de glutamato, dopamina y GABA intersticiales de cada dializado con respecto al dializado uno (Línea base); la barra negra indica el periodo de perfusión del antagonista selectivo GR 103,691 (100 nM). D, E y F muestran el cambio en la distancia ambulatoria en centímetros, cuentas no ambulatorias y giros contralaterales, cada parámetro correspondiente a los 20 minutos en los cuales cada dializado fue colectado. * $p < 0.05$, y *** $p < 0.001$ con respecto al dializado tres (antes de la inyección del antagonista), ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=8$ ratas por grupo.

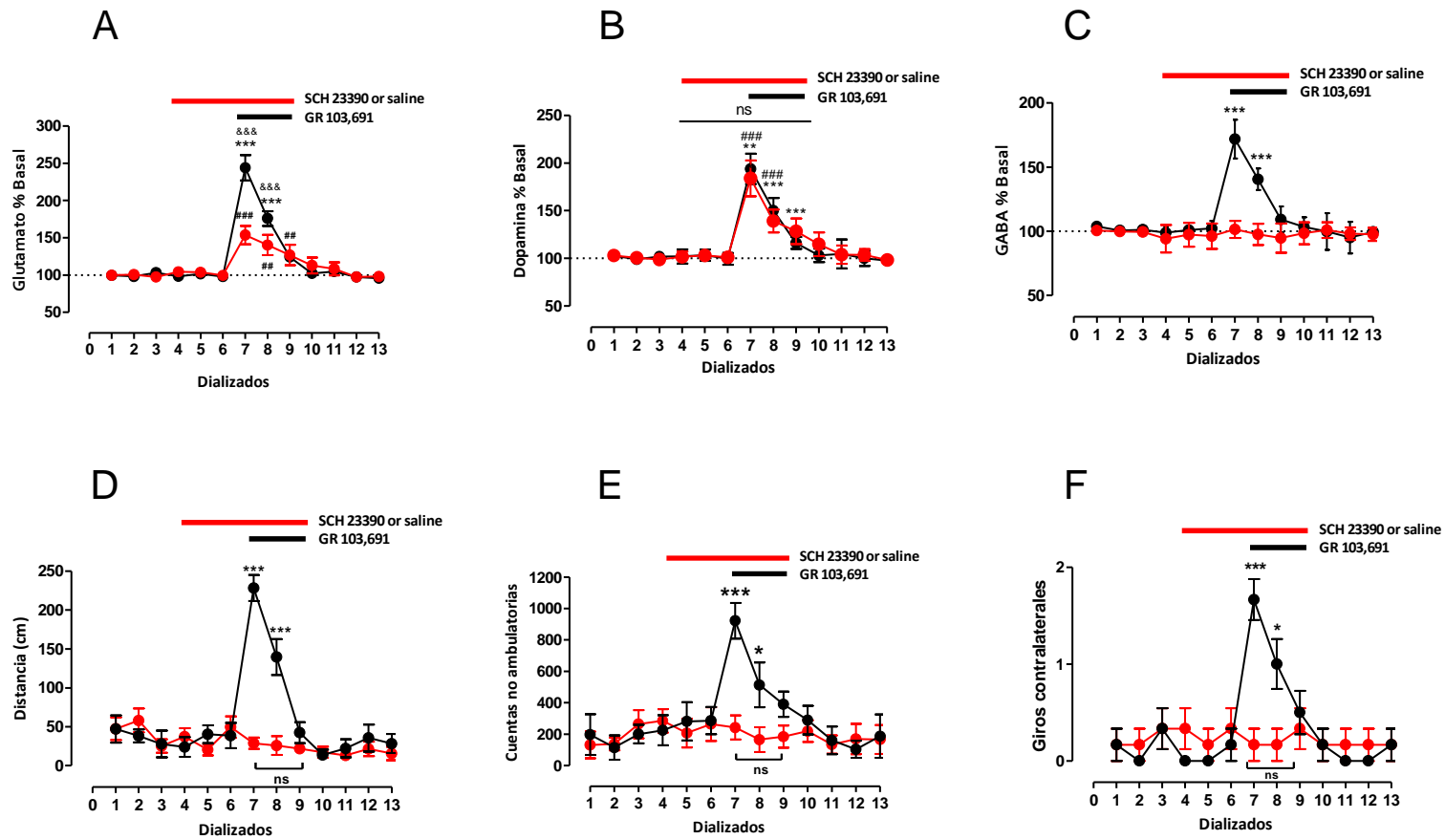


Figura 17. El bloqueo intranigral del receptor D1 previene el efecto conductual que produce el antagonista D3 y disminuye el incremento de glutamato y GABA. A, B, y C muestran el efecto del bloqueo intranigral del receptor D1 con SCH 23,390 (1 μ M, del dializado tres al ocho) sobre la concentración intersticial de glutamato, dopamina y GABA solo y en co-perfusión del antagonista del receptor D3 GR 103,691 (100 nM, del dializado seis al ocho). Los círculos negros indican un grupo de animales perfundidos con solución salina en lugar de SCH23390 como control para el grupo de los círculos rojos, perfundido con SCH23390 antes del bloqueo del receptor D3. D, E, y F muestran el efecto conductual de la co-perfusión de los antagonistas sobre la distancia ambulatoria, cuentas no ambulatorias y giros contralaterales, respectivamente. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ con respecto al dializado seis (grupo de círculos negros); ### $p < 0.001$ con respecto al dializado seis (grupo de círculos rojos); y &&& $p < 0.001$ (grupo negro vs. Grupo rojo); ns, sin diferencias significativas entre dializados. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=6$ ratas por grupos.

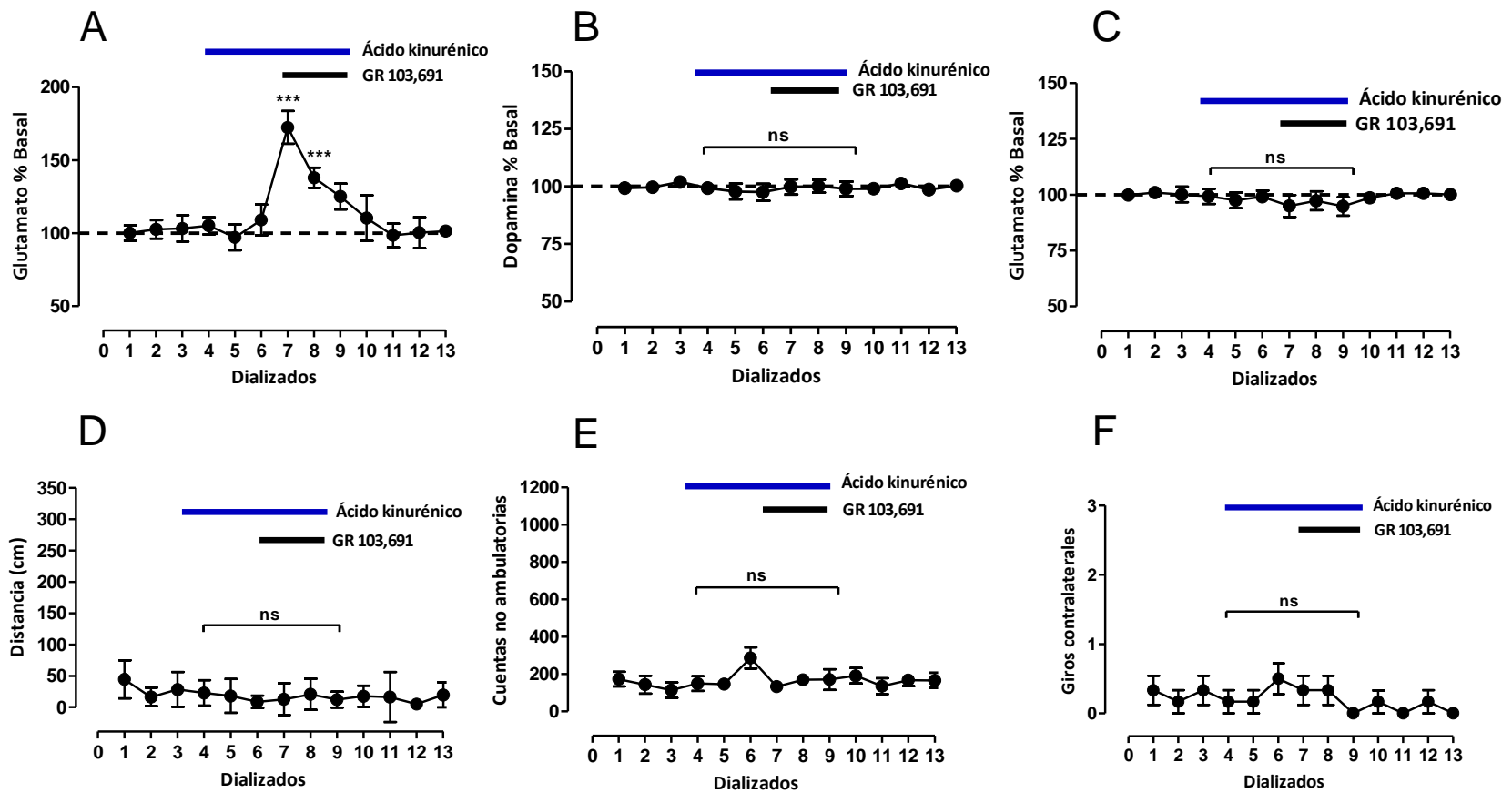


Figura 18. El bloqueo intranigral del receptor NMDA previene los incrementos de dopamina y GABA y los efectos conductuales motores, inducidos por el bloqueo del receptor D3. A, B y C muestran el efecto del bloqueo del receptor NMDA intranigral con ácido kinurénico (500 μ M, del dializado tres al ocho) sobre la concentración intersticial de glutamato, dopamina y GABA, solo o en co-perfusión del antagonista D3 GR 103,691 (100nM, del dializado seis al ocho). D, E y F muestran los efectos conductuales de la co-perfusión de los antagonistas sobre la distancia ambulatoria, cuentas no ambulatorias y giros contralaterales, respectivamente. *** $p < 0.001$ con respect al dializado seis; ns, no diferencia significativa entre dializados. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=6$ ratas por grupo.

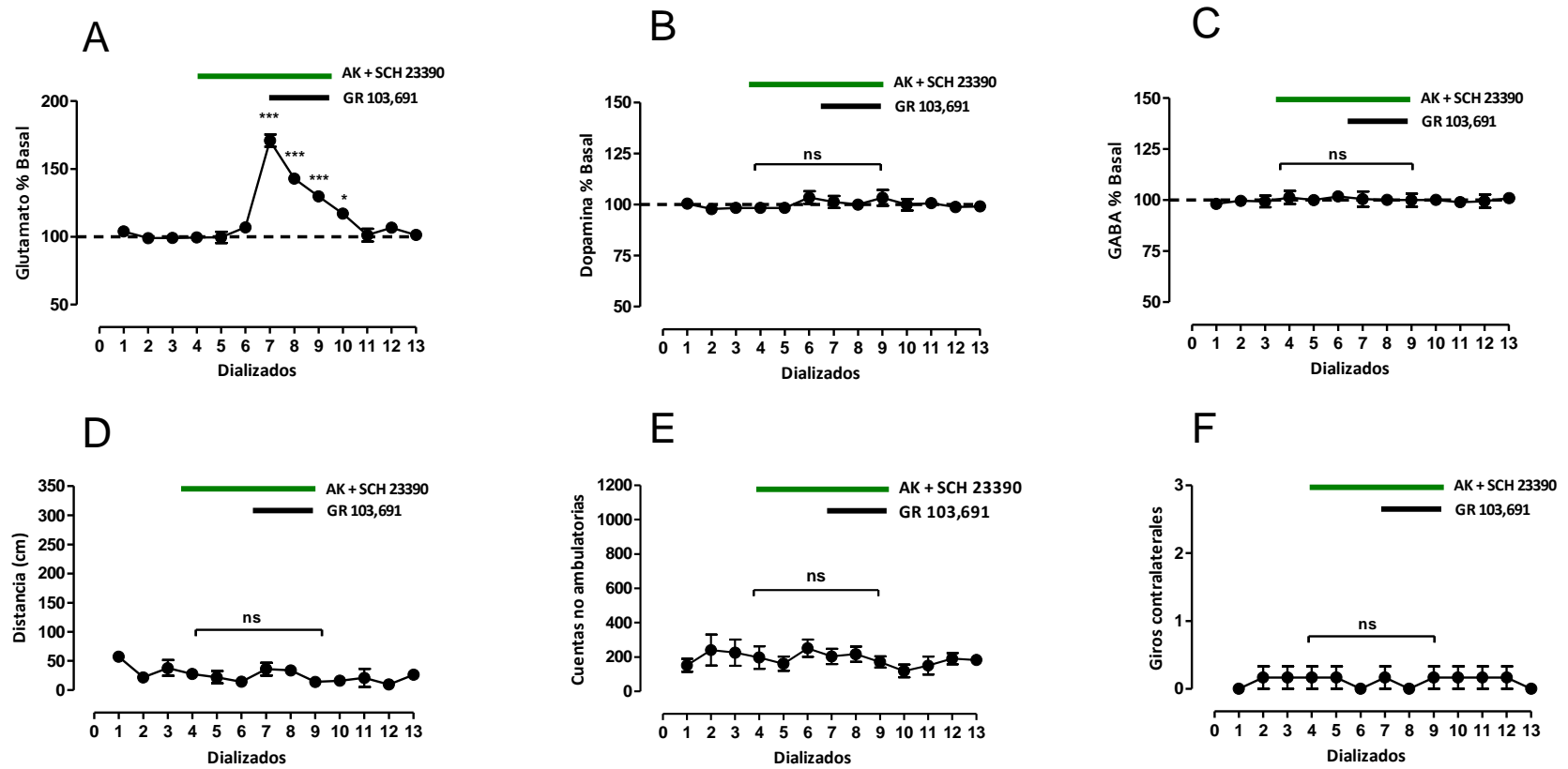


Figura 19. El bloqueo concomitante de los receptores NMDA y D1 previenen el incremento de dopamina, GABA y los efectos conductuales motores, pero no el incremento de glutamato, inducido por el bloqueo del receptor D3. **A, B, y C** ilustran el efecto del bloqueo intranigral del receptor NMDA con ácido kinurénico y del receptor D1 con SHC 23390 (500 μ M and 1 μ M, respectivamente, del dializado tres al ocho) sobre la concentración intersticial de glutamato, dopamina y GABA, juntos o en co-perfusión del antagonista D3 GR 103,691 (100 nM, del dializado tres al ocho). **D, E, y F** muestran los efectos conductuales de la co-perfusión de los antagonistas sobre la distancia ambulatoria, cuentas no ambulatorias y giros contralaterales, respectivamente. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.005$ con respecto al dializado seis; ns, no diferencias significativas entre dializados. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=6$ ratas por grupo.

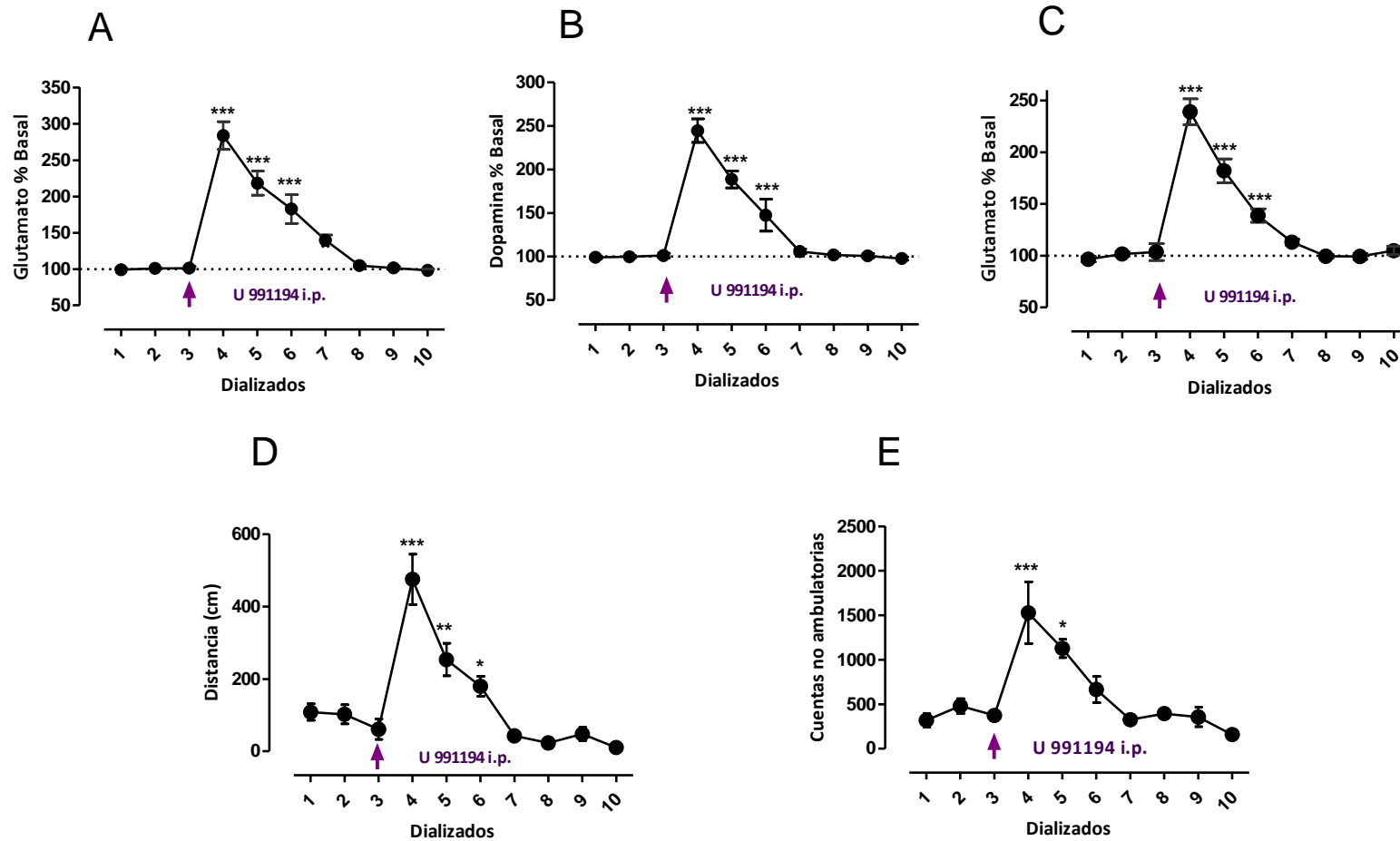


Figura 20. El bloqueo sistémico del receptor D3 con U99194A incrementa el glutamato, dopamina y GABA intranigrales y la actividad locomotora. A, B y C muestran el porcentaje de cambio del glutamato, dopamina y GABA intersticial con respecto al dializado 1 (Línea base), y la flecha indica la inyección de una dosis única del antagonista D3 U99194A (25 mg/Kg i.p.) D y E muestran el cambio de la distancia ambulatoria en centímetros, y cuentas no ambulatorias, cada parámetro correspondiente a los 20 minutos en los cuales cada dializado fue colectado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, y *** $p < 0.001$ con respecto al dializado tres (antes de la inyección del antagonista), ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=6$ ratas por grupo.

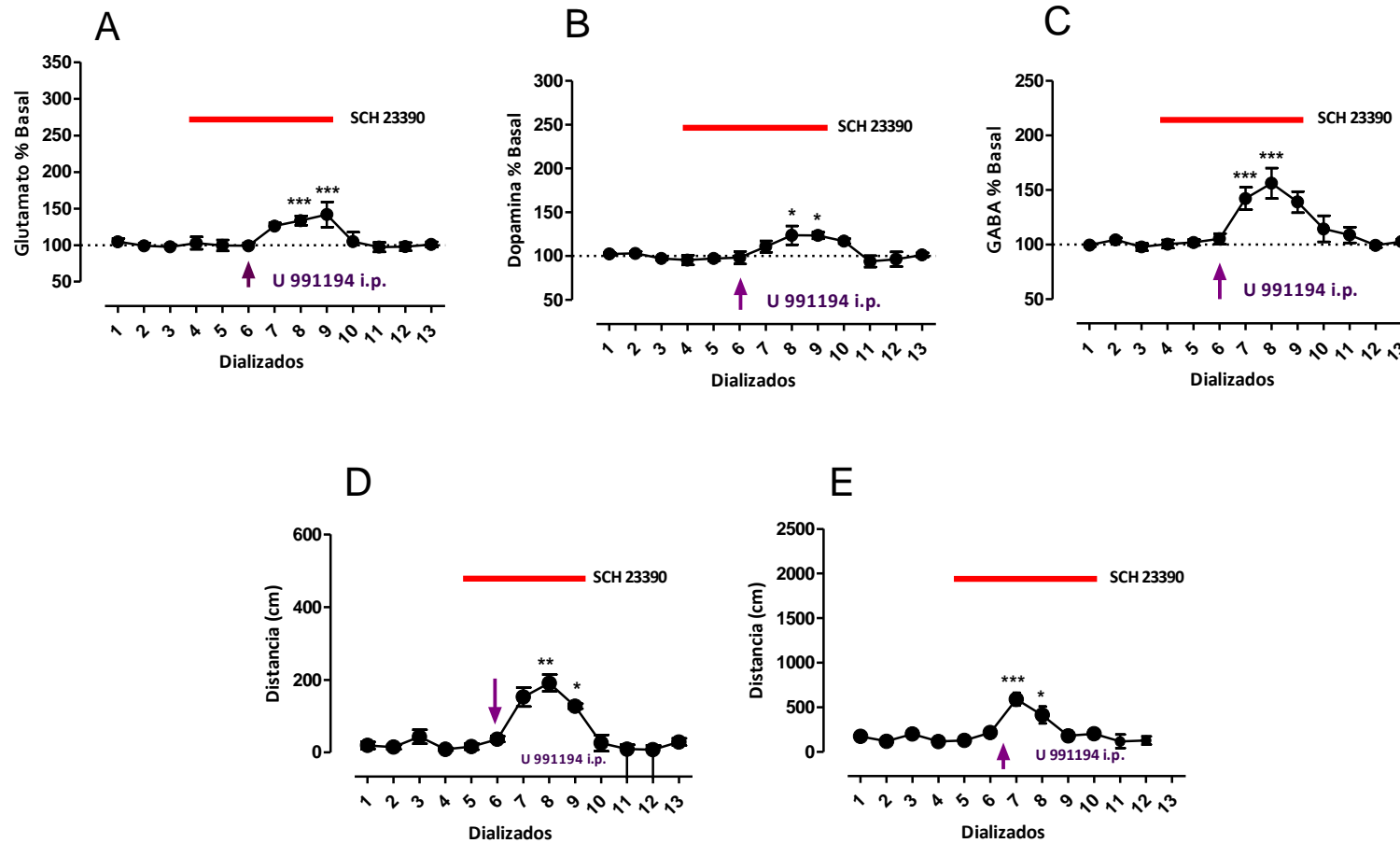


Figura 21. El bloqueo intranigral del receptor D1 disminuye los incrementos en los neurotransmisores y actividad locomotora que produce el bloqueo sistémico del receptor D3. **A, B y C** muestran el porcentaje de cambio de glutamato, dopamina y GABA intersticial con respecto al dializado 1 (Línea base), la flecha indica la inyección de una dosis simple del antagonista selectivo D3 U991194A (25 mg(Kg i.p.)). **D y E** muestran el cambio en la diatcia ambulatoria en centímetros y cuentas no ambulatorias, cada parámetro correspondiente a los 20 minutos en los cuales cada dializado fue colectado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, y *** $p < 0.001$ con respecto al dializado tres (antes de la inyección del antagonista), ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=6$ ratas por grupo.

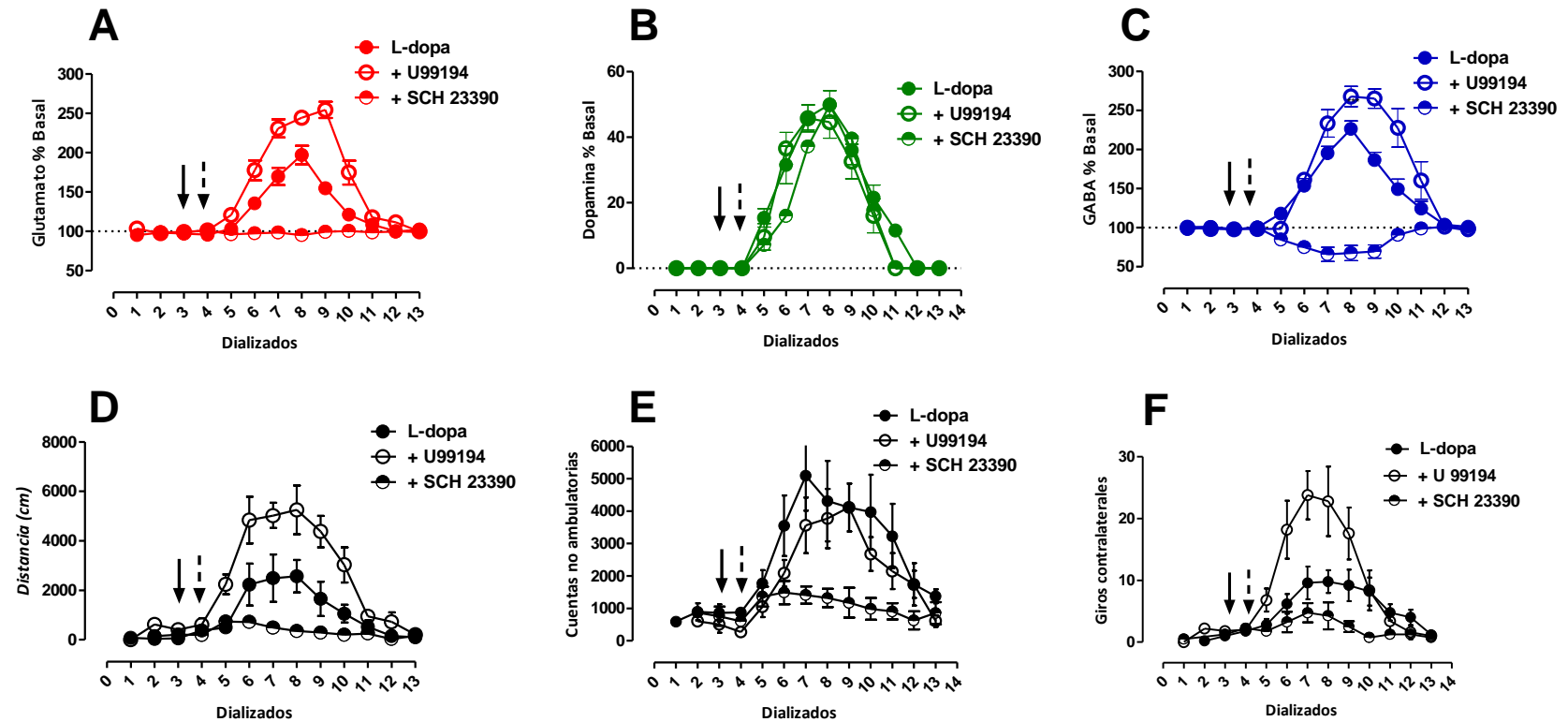


Figura 22. El bloqueo sistémico del receptor D1 previene el efecto conductual que produce la administración sistémica de L-Dopa 10 mg/Kg y la administración concomitante de L-Dopa y el antagonista D3 U99194 y disminuye una fracción del incremento de GABA que se produce en ambos experimentos. A, B, y C muestran el efecto del bloqueo sistémico del receptor D1 con SCH 23,390 (0.1 mg/Kg) sobre la concentración intersticial de glutamato, dopamina y GABA solo y en co-perfusión del antagonista del receptor D3 U99194. Los círculos llenos indican un grupo de animales administrados con L-Dopa 10 mg/Kg, los círculos vacíos corresponden a un grupo de animales administrados con el antagonista U99194 (25 mg/Kg) al dializado tres y L-Dopa 10 mg/Kg al dializado 4, los círculos semivaciados representan el grupo de animales administrados con ambos antagonistas (D1 y D3) al dializado tres y L-Dopa 10 mg/kg al dializado cuatro. D, E, y F muestran el efecto conductual de la co-perfusión de los antagonistas sobre la distancia ambulatoria, cuentas no ambulatorias y giros contralaterales, respectivamente. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ con respecto al dializado tres de cada grupo. ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey, $n=6$ ratas por grupos.

Figura 16.
GR 103691

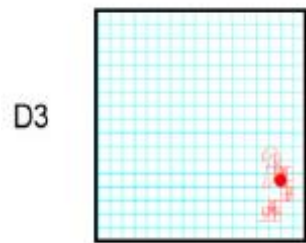
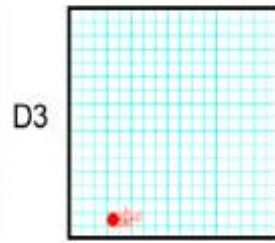
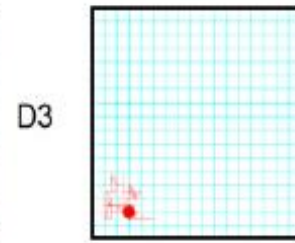


Figura 17.
SCH 23390



**Figura 18. Ácido
kinurénico**



**Figura 19. AK+
SCH+ +GR103691**

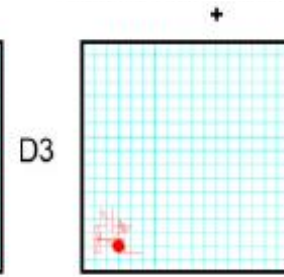
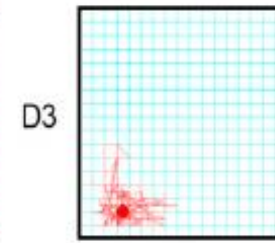


Figura 20.
U991194



**Figura 21. SCH +
U99194**

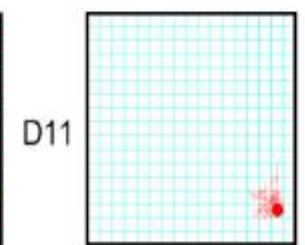
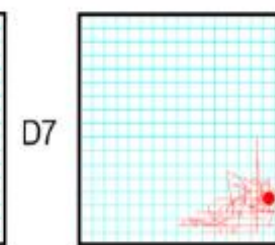
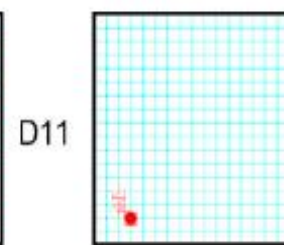
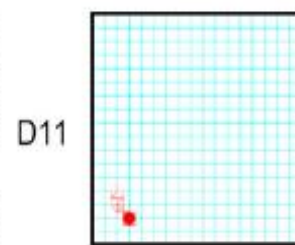
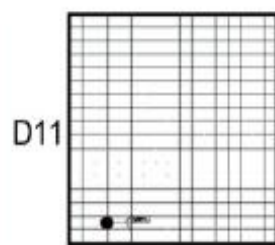
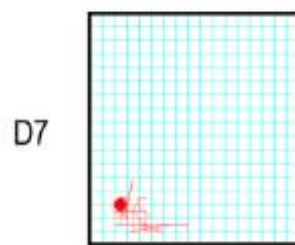
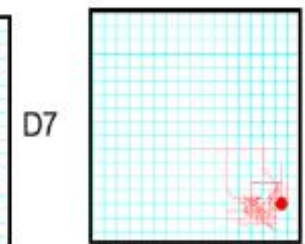
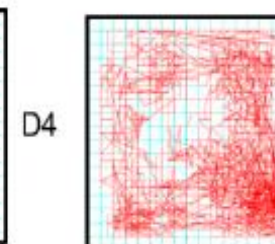
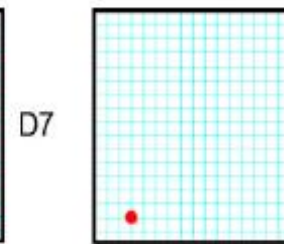
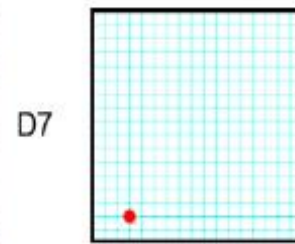
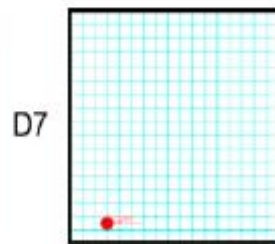
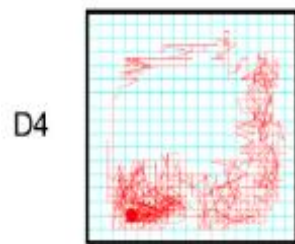
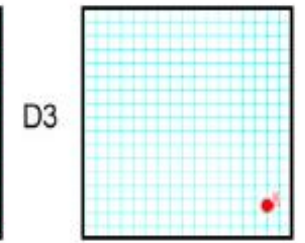


Figura 23. Representación gráfica de los registros de actividad locomotora de una rata de cada grupo experimental. El cuadro representa el campo de desplazamiento de la rata y la línea roja el trayecto durante los veinte minutos correspondientes al dializado indicado.

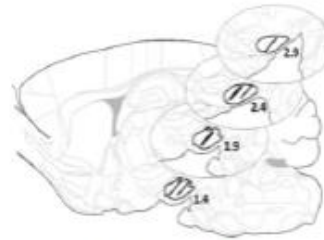


Fig. 16 GR103691

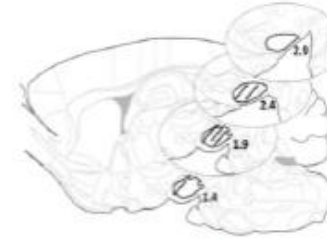


Fig. 17 GR103691

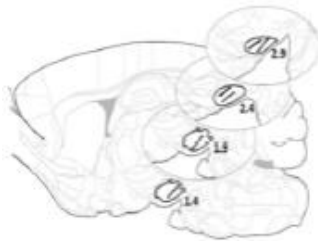


Fig. 17 SCH + GR103691

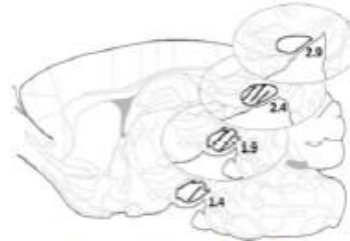


Fig. 18 Ácido kunirénico+
GR103691

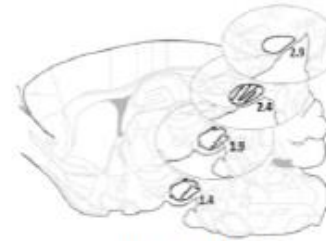


Fig. 19 AK+SCH+
GR103691

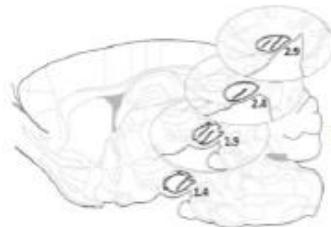


Fig. 20 U991194

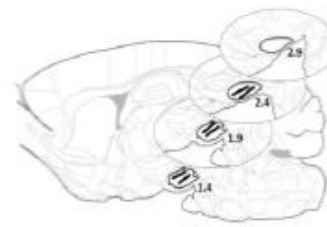


Fig. 21 SCH+
GR103691

Figura 24. Localización de la cánula de microdialisis dentro de la SNr en cada experimento. Las imágenes de las rebanadas sagitales de cada experimento fueron comparadas con el atlas de Paxinos y Watson. En la parte superior

9. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren fuertemente que el receptor D3 localizado presinápticamente en las terminales subtálamo-nigrales modula la interacción entre glutamato-dopamina-GABA en la SNr, mediante el control que ejerce sobre la liberación de glutamato. Los datos indican que el glutamato produce un incremento de la liberación de dopamina a través de receptores NMDA y esto a su vez genera cambios en la liberación de GABA por la activación del receptor D1, produciendo aumentos en la actividad motora. De manera interesante, el bloqueo sistémico del receptor D3 modifica la liberación de neurotransmisores de manera similar que el bloqueo intranigral local. Por lo tanto, el efecto que se produce a nivel local podría ayudar a explicar el efecto conductual producido por la administración sistémica de los antagonistas D3, lo cual demuestra el papel central de dichos receptores sobre la actividad locomotora.

Por otra parte, en el caso del papel del receptor D3 en condiciones de Parkinson experimental, el bloqueo de este receptor incremento los niveles de glutamato y GABA con aumentos significativos de la actividad motora, lo cual se previene por el bloqueo de los receptores D1, indicando una interacción entre los receptores, pero diferente de la que ocurre en la condición normal.

9.1 Fármacos utilizados

El antagonista selectivo GR103691 fue utilizado para boquear al receptor D3 de forma local. Este fármaco tiene una afinidad mayor por el receptor D3 que por el D2, cuenta con una $K_i=0.4$ nM por D3 (Briones-Lizardi et al., 2019). En base a estimación de las barreras para difusión de fármacos en experimentos de microdiálisis reversa (Kho C., et al 2017), se usó una concentración de 100 nM de dicho fármaco con el objetivo de alcanzar una concentración aproximada de 10 nM en el espacio intersticial y asegurar la activación de los receptores D3. Puesto que la K_i del GR103691 es 60 veces mayor para el receptor D2 (también presente en terminales subtálamo-nigrales) que para el D3 (Audinot, V. et al.,

1996), la concentración del antagonista que alcanza el espacio intersticial permitiría el bloqueo preferencial del receptor D3.

Por otra parte, el antagonista U99194A tiene una K_i que oscila entre 78-220 nM para el receptor D3, la cual es 10-100 veces mayor que para el receptor D2 (Waters N. et al., 1993). Este se utilizó para el bloqueo sistémico del receptor D3 debido a que posee una alta capacidad para cruzar a través de la barrera hematoencefálica y una mejor distribución sistémica que el antagonista GR103691 (Audinot, V. et al., 1996).

9.2 Efecto de la perfusión de GR103691 en la sustancia nigra pars reticulata de la rata, sobre los niveles extracelulares de dopamina, GABA y glutamato; y sobre la actividad motora

Aunque se ha demostrado que el receptor D3 se expresa en terminales estriado-nigrales, subtálamo-nigrales y dendritas dopaminérgicas, su participación en la conducta motora no ha sido completamente esclarecida. Por lo anterior y dada la cercanía de las diversas sinapsis, dendritas y terminales, podría esperarse que el bloqueo del receptor D3 produzca cambios en la neurotransmisión de la SNr, lo cual directa o indirectamente modificaría la actividad de las neuronas nigro-talámicas y por lo tanto la actividad motora. Los resultados del presente trabajo demostraron que la administración unilateral del antagonista D3, GR103961 en la SNr, produce un incremento en la conducta motora y en la asimetría locomotora. (Figura 16D y 16F). Dado que el receptor D3 se encuentra expresado en diversas aferentes de la SNr de diferente naturaleza, son varias las explicaciones de como el bloqueo de este receptor afecta la actividad motora.

Inicialmente, la activación o bloqueo de los receptores D3 de las dendritas dopaminérgicas, que regulan la liberación de dopamina por medio de una función de autoreceptor, podría cambiar la actividad locomotora a través de una modificación de la liberación de GABA o glutamato, ya que las aferentes expresan receptores de dopamina presinápticos. En ese sentido, se ha mostrado que la dopamina que se libera de las dendritas, controla la liberación de glutamato de las terminales subtálamo-nigrales principalmente por medio de receptores D3 altamente sensibles a la dopamina (Ibanez-Sandoval, O. et al., 2006; Shen, K.-Z et al., 2012). Por lo tanto, los cambios en la dopamina

intersticial podrían modificar inicialmente la actividad subtálamo-nigral mediada por receptores D3. Es decir, la activación del autoreceptor D3 disminuiría la liberación de dopamina y concomitantemente la actividad del receptor D3 subtálamo-nigral, lo cual aumentaría el nivel de glutamato e incrementaría la actividad de las neuronas de la SNr, produciendo finalmente inhibición de las neuronas tálamo-corticales y disminución de la actividad motora. De manera inversa, el bloqueo del autoreceptor D3 aumentaría la dopamina, lo que a su vez estimularía el receptor D3 subtálamo-nigral, disminuyendo la liberación de glutamato y la actividad de la SNr e incrementando la actividad motora. Este mecanismo propuesto es compatible con los efectos observados en la actividad motora por el bloqueo de los receptores D3 (Figuras 16D y 16E). Sin embargo, dicho mecanismo implicaría actividad tónica de los autoreceptores D3, lo cual no fue respaldado por nuestros datos experimentales. Aunque nuestros resultados demostraron un aumento en los niveles de dopamina después del bloqueo del receptor D3 (Figura 16B), el bloqueo del receptor NMDA con ácido kinurénico (Birch et al 1988) (Figuras 18B y 19B) previno el efecto de este bloqueo y el nivel de dopamina permaneció igual al nivel basal, mientras que el aumento de glutamato se mantuvo (Figuras 18A y 19A). Por lo cual no se pudo confirmar actividad tónica del autoreceptor D3; sin embargo, sí fue posible observar un efecto tónico de la dopamina sobre la liberación de glutamato a través de los receptores D3 presinápticos (Figuras 16A, 17A, 18A y 19A). Estos hallazgos descartan un papel sustancial del autoreceptor D3 en los cambios observados en la liberación de neurotransmisores y la actividad motora por el bloqueo del receptor D3. Una explicación de la aparente falta de participación de autoreceptores D3 en el bloqueo intranigral del mismo, sería su previamente sugerida poca contribución en la regulación de la liberación de dopamina (Joseph J et al, 2002; Hiron del et al 1998).

En cuanto al receptor D3 estriado-nigral, se sabe que dicho receptor controla la liberación de GABA conjuntamente con el receptor D1 (Avalos-Fuentes et al., 2013). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, el receptor D3 estriado-nigral no participó en la actividad motora producida por el bloqueo del receptor D3, ya que se observó un

incremento en la liberación de GABA solamente cuando el receptor D1 fue activado (Figuras 16C y 17D).

Por otra parte, los resultados demuestran que el receptor D3 subtálamo-nigral se encuentra tónicamente activado por la dopamina endógena (Figuras 16A, 17A, 18A y 19A). Teóricamente, la estimulación del núcleo subtalámico aumentaría la actividad de las neuronas de la SNr (Feger J. *et al.*, 1998) en un mecanismo complejo que involucra la activación del receptor AMPA y NMDA (Ammari R. *et al.*, 2010). De acuerdo con este mecanismo, el bloqueo del receptor D3 produciría un aumento en la liberación de glutamato, conduciendo a la activación de los receptores ionotrópicos en las neuronas de salida GABAérgicas y al aumento de su frecuencia de disparo. En consecuencia, esto producirá una disminución en la actividad tálamo-cortical y, por lo tanto, disminuirá la actividad motora. Sin embargo, nuestros resultados exhibieron un efecto opuesto: un aumento en la actividad motora a pesar del aumento en la liberación de glutamato observado (Figura 16A), descartando un efecto directo del glutamato en las neuronas de salida como responsables de los efectos conductuales observados.

En resumen, los mecanismos mediados por el bloqueo del autorreceptor D3, el receptor D3 estriato-nigral o subtálamo-nigral presináptico y sus posibles efectos sobre las neuronas nigro-talámicas no permiten explicar los efectos conductuales observados; por lo cual debería haber un mecanismo alterno.

9.3 Interacción recíproca entre glutamato, dopamina y GABA, y efectos motores producidos por bloqueo intranigral del receptor D3

Debido a que el bloqueo de los receptores D3 nigrales en una sola terminal no explica los efectos sobre la conducta motora y los cambios en los niveles de neurotransmisores observados en los experimentos de microdiálisis, es factible que exista un mecanismo más complejo en la SNr que provoca incrementos en la actividad motora. Por este motivo se exploró la interacción recíproca entre glutamato, dopamina y GABA previamente descrita por Rosales et al 1997. En esta interacción, la estimulación de la actividad de las neuronas subtálamo-nigrales y el glutamato liberado en SNr aumentó los tres neurotransmisores por un mecanismo similar (Rosales et al 1997).

De acuerdo con esta propuesta, los cambios en el glutamato intersticial producen la estimulación de la liberación de dopamina a través de receptores NMDA de las dendritas dopaminérgicas, posteriormente, la dopamina liberada activa receptores D1 localizados en las terminales estriato-nigrales y subtálamo-nigrales, reforzando la liberación de glutamato y promoviendo de manera importante la liberación de GABA. La secuencia de liberación de los neurotransmisores en este mecanismo indica que el cambio en el glutamato intersticial es el primer paso en la neurotransmisión (Rosales M. et al 1994); en nuestros experimentos se observó que un aumento en el glutamato por el bloqueo del receptor D3 subtálamo-nigral presináptico también desencadena el mecanismo descrito. Nuestros resultados indican que el receptor D3 subtálamo-nigral es el único de los tres receptores D3 nigrales que presentó actividad tónica, ya que el glutamato es el único de los tres neurotransmisores que permanece aumentado en comparación de su nivel basal después del bloqueo de los receptores NMDA y/o D1 (Figuras 16 y 17).

Existen dos posibles factores que podrían explicar por qué no todos los receptores D3 están activados tónicamente. En primer lugar, la afinidad de los receptores D3 subtálamo-nigrales, striato-nigrales y los autoreceptores por la dopamina no se ha determinado en nuestras condiciones experimentales, sin embargo, a partir de datos bibliográficos, es posible compararlos (Pugley et al 1995). Se ha mostrado que la IC_{50} sobre la inhibición de la liberación de glutamato del receptor D3 subtálamo-nigral, determinada con ayuda de agonista D3 PD 128,907 es de 7 nM (Briones *et al.*, 2019), mientras que la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del receptor D3 estriato-nigral que potencia la estimulación de la liberación de GABA mediada por receptores D1 es de ≈ 70 nM (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013) y la IC_{50} del receptor D3 dendrítico sobre la inhibición de la liberación de dopamina en el NE es de 250 nM (Maina *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que el más sensible de los tres receptores podría ser el receptor subtálamo-nigral; por lo tanto, es probable que las bajas concentraciones intersticiales de dopamina preferiblemente activen estos receptores.

En segundo lugar, otro aspecto a considerar es la actividad neuronal subtálamo-nigral en comparación con las neuronas dopaminérgicas y estriato-nigrales. Las neuronas

subtalámicas muestran actividad intrínseca *in vivo* a frecuencias de disparo que varían de 25 a 50 Hz (Windels et al 2003), las neuronas dopaminérgicas de la SNc de 5–10 Hz (Grace et al 1983) y las neuronas estriato-nigrales son silentes o disparan a 2.1 Hz (Kiyatkin et al 1996). En ese sentido, en los experimentos de microdialisis realizados se encontraron concentraciones basales de glutamato de 298 fmol/ μ L, en comparación con 5.82 de dopamina y 33.5 de GABA, lo cual refleja las diferencias en la actividad de sus respectivas neuronas. Esto indica una alta actividad de las neuronas subtalámicas que a su vez liberan altos niveles de glutamato y requieren una modulación fina, la cual es proporcionada por la dopamina a través del receptor D3 para mantener una concentración constante de glutamato intranigral. Por lo tanto, el bloqueo del receptor D3 por la inyección de GR103691 estaría interrumpiendo este mecanismo y desencadenando una cascada de activación de receptores presinápticos y postsinápticos, cuyo efecto final promueve la actividad motora.

Sin embargo, los cambios en la dopamina o glutamato no explicarían los cambios motores producidos por el bloqueo del receptor D3, para ello sería necesario considerar el aumento en las concentraciones de GABA en la SNr. Con respecto a esto, nuestros experimentos revelaron que después del incremento de glutamato, tiene lugar la activación de receptores NMDA que produce un aumento de dopamina intersticial (Figuras 18B y 19B). Posteriormente, el aumento de la concentración de dopamina estaría promoviendo la activación del receptor D1, localizado en las aferentes estriato-nigral y subtálamo-nigral, lo cual es respaldado por el hecho de que el bloqueo del receptor D1 con SCH23390 previno el incremento de GABA y disminuyó parcialmente la concentración de glutamato (Figuras 17A-17C). Tomando en cuenta que las aferentes estriatales que expresan al receptor D1 representan el 90% de las terminales en la SNc y que la afinidad del receptor D1 por la dopamina reportada en la bibliografía para este receptor es mayor que por el receptor D1 subtálamo-nigral, es probable que el incremento de dopamina produzca la activación preferencial de los receptores D1 estriado-nigrales, incrementando la liberación de GABA y la actividad motora. Por lo tanto, la disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas nigrales mediada por receptores D1 presinápticos (Jackson et

al 1983; Starr et al 1985) y receptores GABA A posinápticos, produce una desinhibición de los núcleos premotores talámicos y conduce al aumento en la conducta motora. El hecho de que el bloqueo del receptor D1 previno el aumento de GABA refuerza esta propuesta (Figura 17). Adicionalmente, el papel determinante de los receptores D1 y GABA A en la conducta motora es respaldado por algunos datos bibliográficos.

Primero, el bloqueo de los receptores D1 previene completamente los aumentos en la concentración de GABA y la conducta motora (Trevitt et al 2001). Adicionalmente, en este trabajo se mostró que el bloqueo del receptor NMDA también previene el aumento de GABA y de la actividad motora (Figuras 18 y 19), indicando que el receptor D1 no ha sido activado en esta condición, además de que el antagonista D1 SCH23390 no modifica de manera significativa los niveles de los neurotransmisores medidos, evidenciando que no hay actividad tónica por parte de dicho receptor. Por otro lado, la liberación de GABA en la SNr debida a la estimulación del receptor D1 es suficiente para promover la actividad motora, aunque ambos receptores (estriado-nigral y subtálamo-nigral) se activen al inyectar su agonista (Jackson et al 1983; Starr et al 1985).

En segundo lugar, se sabe que el receptor GABA A es determinante para la actividad motora, ya que el bloqueo intranigral de dichos receptores previene todos los efectos motores que produce el agonista D1 (Trevitt et al 2002). Por lo cual, aunque los receptores a glutamato postsinápticos están siendo activados, no parecen tener participación directa en la estimulación motora, aunque si producen cambios en los niveles de GABA de manera indirecta por la salida de dopamina a través de la activación de los receptores NMDA.

Por último, es relevante mencionar que el GABA estimula la actividad motora y no el glutamato, ya que el agonista de receptores GABA muscimol, induce giros contralaterales, mientras que los agonistas glutamatérgicos producen giros ipsilaterales (Martin et al 1978; Arnt et al 1971). Se ha sugerido que las neuronas de salida muestran más sensibilidad a GABA que a glutamato con respecto a cambios en su frecuencia de disparo (Windels et al 2006).

También existe evidencia de que los receptores GABA A están más densamente expresados en la SNr que los receptores NMDA. Sin embargo, es posible que la actividad

de los receptores NMDA que estimulan el disparo de las neuronas dopaminérgicas de la SNc puedan producir un incremento no solo en la liberación de dopamina en la SNr, también en el NE (Westerink et al 1992). Lo anterior llevaría a la activación de receptores D1 y D2 postsinápticos localizados en neuronas estriatales, incrementando la actividad estriado-nigral y disminuyendo la estriado-palidal, respectivamente (Gerfen et al., 2011), promoviendo así la actividad motora observada. Sin embargo, el hecho de que el bloqueo del receptor D1 previno los efectos conductuales y el aumento de GABA (Figura 17), descarta esta posibilidad; por lo cual esta estimulación de la liberación de GABA no involucraría algún mecanismo fuera de la SNr.

Es importante tomar en cuenta que los efectos de la dopamina en las neuronas estriatales se rigen sobre la actividad estimulada por la corteza, y esto a su vez es iniciado por señales sensoriales que detecta la corteza, es decir es movimiento voluntario (Albin *et al.*, 1989). Bajo nuestra condición experimental, las ratas no tienen movimiento voluntario, ya que la distancia ambulatoria y cuentas no ambulatorias son muy bajas antes de la perfusión del antagonista (Figuras 16A–16C) y además fueron habituadas durante 1 h antes del experimento.

Por otra parte, en la etapa final del efecto de la perfusión del antagonista D3, la dopamina activa al receptor D1 subtálamo-nigral presináptico, aumentando el glutamato intersticial que refuerza la interacción recíproca entre los tres neurotransmisores. A pesar de que el bloqueo del receptor D3 fue mantenido constante durante la perfusión, los niveles de neurotransmisores disminuyeron y regresaron a niveles basales, lo que sugiere un mecanismo que regula o detiene dicha interacción. Es factible suponer que la difusión del fármaco en el tejido, o bien su metabolismo, sean factores que contribuyan a que los neurotransmisores regresen a las concentraciones iniciales. Sin embargo, otras opciones podrían ser consideradas; por ejemplo, el glutamato puede disminuir la liberación de GABA y glutamato a través de la activación de receptores presinápticos metabotrópicos (Wittmann *et al.*, 2001). De igual manera, la activación del receptor GABA B por el GABA liberado podría disminuir la liberación de GABA estimulada por receptores D1 (Nava-Asbel *et al.*, 2007), la liberación de glutamato estimulada por depolarización y la liberación de

dopamina. Por lo tanto, los receptores a GABA y glutamato podrían regular el efecto del incremento de glutamato producido por el bloqueo del receptor D3, a través de la regulación múltiple de los tres neurotransmisores. Como conclusión, el bloqueo del receptor D3 intranigral a través del incremento de glutamato, induce la liberación de dopamina y GABA, lo cual estimula la actividad motora.

Cabe señalar que el mecanismo descrito debe ocurrir en un microambiente donde las terminales involucradas tengan cierta proximidad y así los neurotransmisores mencionados puedan activar a los receptores correspondientes. Reforzando la idea anterior, se ha mostrado que las aferentes estriatales y subtalámicas se encuentran cercanas a la sinapsis que se genera entre las dendritas dopaminérgicas y las neuronas GABAérgicas de la SNr (Bevan *et al.*, 1994). Adicionalmente, las dendritas dopaminérgicas en la SNr reciben aferentes del núcleo estriado y del subtálamo (Henry *et al.*, 2012), por lo cual la distribución anatómica es ideal para la interacción entre neurotransmisores. De igual manera, el glutamato y la dopamina cuentan con una buena capacidad de difusión, lo cual es de importancia ya que los receptores D1 son extrasinápticos y probablemente los D3 y NMDA también lo sean (Yung *et al.*, 1995; Chata *et al.*, 2000). Por lo anterior, la interacción glutamato, dopamina y GABA en la SNr es factible. (Figura 10).

9.4 Efectos conductuales del bloqueo local y sistémico del receptor D3

Uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo es que el bloqueo sistémico del receptor D3 tiene los mismos efectos neuroquímicos y conductuales que produce el bloqueo local del mismo. A partir de estudios donde se bloquea o estimula de manera selectiva al receptor D3 se ha propuesto que el autorreceptor D3 podría ser el responsable de los efectos conductuales (Dansma *et al.*, 1993; Pugsley 1995; Bristow *et al.*, 1996). Sin embargo, otros autores han propuesto al receptor postsináptico D3 (Waters *et al.*, 1993; Svennson *et al.*, 1994; Pritchard *et al.*, 2007; Hadssma *et al.*, 1998), que además tiene una alta expresión en el estrado ventral (Sokoloff *et al.*, 1990) y se ha mostrado que su manipulación farmacológica tiene efectos conductuales parecidos a la aplicación sistémica (Kling *et al.*, 1995; Ouagazzal *et al.*, 2000). La última propuesta es respaldada por el hecho de que los efectos conductuales por la administración de los fármacos dirigidos al receptor

D3 no correlacionan con los cambios en los parámetros del autorreceptor D3, como la concentración de dopamina en los núcleos blanco o cambios en su síntesis (Waters *et al.*, 1993; Svensson *et al.*, 1994; Haadsma *et al.*, 1998; Reavill *et al.*, 2000). Los resultados de este trabajo también mostraron un rol importante del receptor D3 nigral en la conducta motora, ya que el bloqueo del receptor D1 nigral (Figura 17, 19 y 21) disminuyó los incrementos de los neurotransmisores y la actividad motora que produjo la administración sistémica del antagonista D3. Por lo tanto, es posible suponer que la interacción glutamato-dopamina-GABA en la SNr representa un mecanismo de amplificación de un efecto que se produce también en el estriado ventral.

Algunos trabajos han mostrado mediante diversas manipulaciones farmacológicas que el receptor D1 nigral tiene un papel fundamental en la conducta motora. Por ejemplo, el bloqueo del receptor D1 nigral produce un efecto más potente de inhibición de la actividad motora que el receptor D1 estriatal ó el receptor D1 del NAc, en un modelo de ratas entrenadas (Trevitt *et al.*, 2001). Otro estudio demostró que el bloqueo intranigral de receptores D1 disminuye la actividad motora inducida por anfetamina sistémica. Además, este papel central del receptor D1 nigral también se ha demostrado en condiciones patológicas, como la EP, en la cual un mecanismo nigral amplifica los efectos motores de la dopamina que puede iniciarse en áreas externas. Es pertinente destacar el importante papel de los receptores D1 en los efectos del bloqueo del receptor D3, lo cual está respaldado por el hecho de que el bloqueo sistémico de los receptores D1 previene la hiperactividad conductual provocada por el bloqueo los receptores D3 (Carr *et al.*, 2002; Haadsma *et al.*, 1998) y que la SNr es el sitio más sensible para el bloqueo de los receptores D1 (Trevitt *et al.*, 2001).

Finalmente, durante el bloqueo de los receptores D1 intranigrales, el neurotransmisor que tuvo un incremento más significativo fue GABA, lo cual podría explicar el incremento observado en la actividad motora (Figura 21C, D). La SNr también representa la estación de salida de las vías de referencia de los ganglios ventral y dorsal (Jackson *et al.* 1987). Por lo tanto, es factible pensar que los mecanismos nigrales y mediados por el NAc pueden

ocurrir simultáneamente, ya que hay proyecciones GABAérgicas a la SNr que podrían ser moduladas por receptores D3 (Dray *et al.*, 1977; Strahlendorf *et al.*, 1983).

9.5 Efecto neuroquímico y motor de la L-dopa en condiciones de Parkinson experimental

Es bien conocido que una sola dosis de levodopa puede mejorar drásticamente los signos motores de la EP durante un período limitado de tiempo conocido como “tiempo on” (Lewitt *et al.*, 2008). En los experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo, la administración sistémica de L-Dopa (10 mg/Kg) en ratas hemiparkinsonianas, indujo cambios en la neurotransmisión y conducta de manera relativamente rápida, ya que al dializado siguiente a la administración de dicho fármaco se observaron aumentos en los niveles de los tres neurotransmisores analizados y se registró mayor movimiento de parte de los animales, lo cual comprueba la eficiencia de la L-Dopa en la recuperación motora, (Figura 22). Al tratarse de ratas con una lesión unilateral con 6-OHDA, se observa un desbalance del movimiento evidenciado por los giros contralaterales, lo cual se incrementa por la ya reportada sensibilización de la vía directa y de la señalización del receptor D1 localizado en las terminales estriado nigrales que se encuentra alterada también en condiciones de Parkinson.

La Figura 22B en círculos llenos muestran los cambios en los niveles de dopamina a lo largo del experimento, este porcentaje se normalizó con base en las concentraciones máximas de dopamina determinadas en los animales intactos (~10 nM) de los experimentos anteriores. La administración de L-Dopa (10 mg/Kg) en ratas hemiparkinsonianas incrementó los niveles de dopamina en los dializados 5-9, por lo cual es posible proponer que en pacientes donde la lesión dopaminérgica es parcial se restaure la interacción de neurotransmisores que se expuso anteriormente, ya que además de la dopamina, también se incrementaron el glutamato y GABA.

De manera interesante estos aumentos en la neurotransmisión fueron acompañados por incrementos en la actividad motora (distancia ambulatoria, cuentas no ambulatorias y giros contralaterales). Por lo cual este resultado evidenció la capacidad del fármaco para restaurar la actividad motora en las ratas hemiparkinsonianas.

Aunque se ha mostrado que la inhibición del núcleo de salida es crucial para la generación del movimiento, y que el GABA estriado-nigral es imprescindible para este fin, nuestros

experimentos muestran que además de GABA, también hay aumentos de glutamato producidos por la administración de la L-dopa. Por lo cual es posible que la dopamina que se produce a partir de la L-dopa administrada se encuentre activando los receptores D1 y D3 de las terminales glutamatérgicas pues su liberación incrementa, lo mismo ocurre con la liberación de GABA recordando que también hay receptores D3 que en condición normal potencian la actividad de receptores D1, pero que en la denervación la antagonizan (Ávalos-Fuentes *et al.*, 2013).

Partiendo de un enfoque centrado en la SNr, la activación de receptores D1 en terminales subtálamo-nigrales llevaría al aumento de glutamato en la SNr, mientras que la activación de receptores D1 estriado-nigrales aumentaría el GABA. Teóricamente el glutamato producido por la administración de L-dopa llevaría a la activación de los núcleos de salida y esto al desfavorecimiento del movimiento; sin embargo, es importante mencionar que se ha comprobado que, en el movimiento voluntario, ambas vías (directa e indirecta) se activan y es posible además que el aumento en la salida de glutamato producido por la dopamina forme parte del circuito de interacción que se propuso en este trabajo. Sin embargo, en esta condición particular la ausencia de dendritas dopaminérgicas, frena este circuito de tal forma que solo hay aumentos de GABA y glutamato hasta que la dopamina disponible se difunde o bien es metabolizada. Dada la naturaleza antagónica del GABA y glutamato sobre la actividad de las neuronas nigrales de proyección es muy probable que los efectos conductuales observados sean mediados por GABA y no por glutamato dado que las neuronas nigrales son más sensibles del neurotransmisor inhibitorio (Windels F. *et al.*, 2004; Windels F. *et al.*, 2006), por otro lado, el bloqueo de los receptores D1 previno todos los efectos de la L-Dopa, lo que indica que estos son determinantes para la acción de la misma.

El papel de los receptores D3 en la denervación dopaminérgica es sin duda de gran importancia; este trabajo sugiere que si bien, en condiciones de denervación no hay dopamina disponible para su activación y el funcionamiento del circuito de interacción Glutamato-dopamina-GABA antes propuesto, es posible que la activación farmacológica del mismo lleve a la disminución de la liberación de glutamato por parte de las terminales

subtalámico-nigrales y así a favorecer la restauración motora. En la clínica se usan agonistas D3 que son efectivos en etapas tempranas de Parkinson, como el Pramipexol, Ropirinol y Rotigotina; los tres agonistas dopaminérgicos con afinidades mayores por el receptor D3. (Canovas A. *et al.*, 2011). Estos fármacos han demostrado efectividad al retrasar el uso de Levodopa y por lo tanto la aparición de discinesias. Es por lo anterior que, dentro de las perspectivas de este trabajo, se encuentra proponer el mecanismo de acción de los antagonistas D3 utilizados para la enfermedad de Parkinson, que permitiría tener una noción más precisa de este importante blanco terapéutico.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Los receptores D3 nigrales regulan la actividad motora a través de modular la interacción recíproca entre Glutamato-Dopamina y GABA en condiciones normales.
- ❖ Los fármacos con actividad sobre receptores D3, disminuyen o aumentan la actividad motora cuando son administrados sistémicamente modificando la interacción Glutamato-Dopamina y GABA a nivel de la sustancia nigra.
- ❖ La L-Dopa media sus efectos motores en el Parkinson experimental a través de la activación de receptores D3 y D1 en las terminales subtálamo-nigrales y estriado-nigrales.

11. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Garcia, J., N. Hernandez-Chan, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2009). "D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat." *Neuropharmacology* 57(7-8): 725-730.

Ahlenius, S.; Salmi, P. Behavioral and biochemical effects of the dopamine D3 receptor-selective ligand, 7-OH-DPAT, in the normal and the reserpine-treated rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 260, 177–181.

Albin, R. L., A. B. Young and J. B. Penney (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." *Trends Neurosci* 12(10): 366-375.

Albin, R. L., R. L. Makowiec, Z. R. Hollingsworth, L. S. t. Dure, J. B. Penney and A. B. Young (1992). "Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study." *Neuroscience* 46(1): 35-48.

Alexander, G. E. and M. D. Crutcher (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." *Trends Neurosci* 13(7): 266-271.

Altar, C. A. and K. Hauser (1987). "Topography of substantia nigra innervation by D1 receptor-containing striatal neurons." *Brain Res* 410(1): 1-11.

Amalric, M., A. Ouagazzal, C. Baunez and A. Nieoullon (1994). "Functional interactions between glutamate and dopamine in the rat striatum." *Neurochem Int* 25(2): 123-131.

Ammari, R.; Lopez, C.; Bioulac, B.; Garcia, L.; Hammond, C. Subthalamic nucleus evokes similar long lasting glutamatergic excitations in pallidal, entopeduncular and nigral neurons in the basal ganglia slice. *Neuroscience* 2010, 166, 808–818.

Anderzhanova, E. and C. T. Wotjak (2013). "Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry." *Cell Tissue Res.*

Araneda, R. and G. Bustos (1989). "Modulation of dendritic release of dopamine by N-methyl-D-aspartate receptors in rat substantia nigra." *J Neurochem* 52(3): 962-970.

Ariano, M. A. and D. R. Sibley (1994). "Dopamine receptor distribution in the rat CNS: elucidation using anti-peptide antisera directed against D1A and D3 subtypes." *Brain Res* 649(1-2): 95-110.

Ariano, M. A., J. Wang, K. L. Noblett, E. R. Larson and D. R. Sibley (1997). "Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera." *Brain Res* 752(1-2): 26-34.

Arnt, J. Turning behaviour and catalepsy after injection of excitatory amino acids into rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 1981, 23, 337–342.

Asin, K.; Montana, W. Rotation following intranigral injections of a selective D1 or a selective D2 dopamine receptor agonist in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1988, 29, 89–92.

Atherton, J. F. and M. D. Bevan (2005). "Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons in vitro." *J Neurosci* 25(36): 8272-8281.

Audinot, V., A. Newman-Tancredi, A. Gobert, J. M. Rivet, M. Brocco, F. Lejeune, L. Gluck, I. Desposte, K. Bervoets, A. Dekeyne and M. J. Millan (1998). "A comparative in vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel dopamine D3 receptor antagonists (+)-S 14297, nafadotride, GR 103,691 and U 99194." *J Pharmacol Exp Ther* 287(1): 187-197.

Audinot, V.; Gluck, L., Newman-Tancredi, A.; Bervoets, K.; Deposte, I.; Brocco, M.; Millan, M.J. A comparative in vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel dopamine D3 receptor antagonists (+)-S 14297, nafadotride, GR 103,691 and U 99194. *Eur. Neuropsychopharmacology* 1996, 287, 187–197.

Avalos-Fuentes, A., S. Loya-Lopez, A. Flores-Perez, S. Recillas-Morales, H. Cortes, F. Paz-Bermudez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran (2013). "Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca(2+)-dependent manner." *Neuropharmacology* 71: 273-281.

Bar-Gad, I., G. Morris and H. Bergman (2003). "Information processing, dimensionality reduction and reinforcement learning in the basal ganglia." *Prog Neurobiol* 71(6): 439-473.

Baufreton, J., M. Garret, A. Rivera, A. de la Calle, F. Gonon, B. Dufy, B. Bioulac and A. Taupignon (2003). "D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance." *J Neurosci* 23(3): 816-825.

Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." *Pharmacol Rev* 63(1): 182-217.

Beckstead, R. M., V. B. Domesick and W. J. Nauta (1979). "Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat." *Brain Res* 175(2): 191-217.

Benarroch, E. E. (2012). "GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications." *Neurology* 78(8): 578-584.

Besson, M. J., A. M. Graybiel and M. A. Nastuk (1988). "[³H]SCH 23390 binding to D1 dopamine receptors in the basal ganglia of the cat and primate: delineation of striosomal compartments and pallidal and nigral subdivisions." *Neuroscience* 26(1): 101-119.

Beurrier, C., P. Congar, B. Bioulac and C. Hammond (1999). "Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode." *J Neurosci* 19(2): 599-609.

Bevan, M. D. and C. J. Wilson (1999). "Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons." *J Neurosci* 19(17): 7617-7628.

Bevan, M. D., J. P. Bolam and A. R. Crossman (1994). "Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat." *Eur J Neurosci* 6(3): 320-334.

Bibb, J. A., G. L. Snyder, A. Nishi, Z. Yan, L. Meijer, A. A. Fienberg, L. H. Tsai, Y. T. Kwon, J. A. Girault, A. J. Czernik, R. L. Huganir, H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and P. Greengard (1999). "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons." *Nature* 402(6762): 669-671.

Biggs, C.S.; Fowler, L.J.; Whitton, P.S.; Starr, M.S. NMDA receptor antagonists increase the release of dopamine in the substantia nigra of reserpine-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1996, 299, 83–91.

Birch, P.J.; Grossman, C.J.; Hayes, A.G. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1988, 154, 85–87.

Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli and E. Martignoni (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* 62(1): 63-88.

Bloom, F. E., D. J. Kupfer and A. C. o. *Neuropsychopharmacology* (1995). *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress : An Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, Raven Press.

Blythe, S.N.; Atherton, J.F.; Bevan, M.D. Synaptic Activation of Dendritic AMPA and NMDA Receptors Generates Transient High-Frequency Firing in Substantia Nigra Dopamine Neurons In Vitro. *J. Neurophysiol.* 2007, 97, 2837–2850.

Bokoch, G. M., T. Katada, J. K. Northup, M. Ui and A. G. Gilman (1984). "Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase." *J Biol Chem* 259(6): 3560-3567.

Bolam, J. P., J. J. Hanley, P. A. Booth and M. D. Bevan (2000). "Synaptic organisation of the basal ganglia." *J Anat* 196 (Pt 4): 527-542.

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

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

Bowery, N. G., K. Parry, G. Goodrich, I. Ilinsky and K. Kultas-Ilinsky (1999). "Distribution of GABA(B) binding sites in the thalamus and basal ganglia of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*)." *Neuropharmacology* 38(11): 1675-1682.

Boyes, J. and J. P. Bolam (2003). "The subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in the rat substantia nigra." *Eur J Neurosci* 18(12): 3279-3293.

Boyes, J. and J. P. Bolam (2007). "Localization of GABA receptors in the basal ganglia." *Prog Brain Res* 160: 229-243.

Briones-Lizardi, L.J.; Cortés, H.; Avalos-Fuentes, J.A.; Paz-Bermúdez, F.J.; Aceves, J.; Erij, D.; Florán, B. Presynaptic control of [3H]-glutamate release by dopamine receptor subtypes in the rat substantia nigra. Central role of D1 and D3 receptors. *Neuroscience* 2019, 406, 563–579.

Bristow, L. J., M. S. Kramer, J. Kulagowski, S. Patel, C. I. Ragan and G. R. Seabrook (1997). "Schizophrenia and L-745,870, a novel dopamine D4 receptor antagonist." *Trends Pharmacol Sci* 18(6): 186-188.

Bristow, L.J.; Cook, G.P.; Gay, J.C.; Kulagowski, J.J.; Landon, L.; Murray, F.; Saywell, L.; Young, L.; Hutson, P.H. The behavioural and neurochemical profile of the putative dopamine D3 receptor agonist, (+)-PD 128907, in the rat. *Neuropharmacology* 1996, 35, 285–294.

Caillé, I.; Dumartin, B.; Bloch, B. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res.* 1996, 730, 17–31.

Carlsson, M. and A. Carlsson (1990). "Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease." *Trends Neurosci* 13(7): 272-276.

Carr, K.D.; Yamamoto, N.; Omura, M.; de Vaca, S.C.; Krahne, L. Effects of the D(3) dopamine receptor antagonist, U99194A, on brain stimulation and d-amphetamine reward, motor activity, and c-fos expression in ad libitum fed and food-restricted rats. *Psychopharmacology* 2002, 163, 76–84.

Carter, C. J. (1982). "Topographical distribution of possible glutamatergic pathways from the frontal cortex to the striatum and substantia nigra in rats." *Neuropharmacology* 21(5): 379-383.

Cass, W. A. and N. R. Zahniser (1991). "Potassium channel blockers inhibit D2 dopamine, but not A1 adenosine, receptor-mediated inhibition of striatal dopamine release." *J Neurochem* 57(1): 147-152.

Catania, M. V., H. De Socarraz, J. B. Penney and A. B. Young (1994). "Metabotropic glutamate receptor heterogeneity in rat brain." *Mol Pharmacol* 45(4): 626-636.

Chang, H.; Kitai, S.; Kita, H. The ultrastructural morphology of the subthalamic-nigral axon terminals intracellularly labeled with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1984, 299, 182–185.

Chatha, B.; Bernard, V.; Streit, P.; Bolam, J.P. Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 2000, 101, 1037–1051.

Chemel, B. R., B. L. Roth, B. Armbruster, V. J. Watts and D. E. Nichols (2006). "WAY-100635 is a potent dopamine D4 receptor agonist." *Psychopharmacology (Berl)* 188(2): 244-251.

Chergui, K.; Akaoka, H.; Charley, P.J.; Saunier, C.F.; Buda, M.; Chouvet, G. Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *NeuroReport* 1994, 5, 1185–1188.

Choi, E. Y., D. Jeong, K. W. Park and J. H. Baik (1999). "G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors." *Biochem Biophys Res Commun* 256(1): 33-40.

Christoffersen, C.; Meltzer, L. Evidence for N-methyl-d-aspartate and AMPA subtypes of the glutamate receptor on substantia nigra dopamine neurons: Possible preferential role for N-methyl-d-aspartate receptors. *Neuroscience* 1995, 67, 373–381.

Clifford, J.J.; Waddington, J.L. Heterogeneity of behavioral profile between three new putative selective D3 dopamine receptor antagonists using an ethologically based approach. *Psychopharmacology* 1998, 136, 284–290.

Cobb, W.S.; Abercrombie, E.D. Distinct Roles for Nigral GABA and Glutamate Receptors in the Regulation of Dendritic Dopamine Release under Normal Conditions and in Response to Systemic Haloperidol. *J. Neurosci.* 2002, 22, 1407–1413.

Cohen, B. M., D. J. Ennulat, F. Centorrino, S. Matthyse, H. Konieczna, H. M. Chu and S. Cherkerzian (1999). "Polymorphisms of the dopamine D4 receptor and response to antipsychotic drugs." *Psychopharmacology (Berl)* 141(1): 6-10.

Cortes, H., F. Paz, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2010). "GABA(B) receptors modulate depolarization-stimulated [(3)H]glutamate release in slices of the pars reticulata of the rat substantia nigra." *Eur J Pharmacol* 649(1-3): 161-167.

Cote, S.R.; Kuzhikandathil, E.V. In vitro and in vivo characterization of the agonist-dependent D3 dopamine receptor tolerance property. *Neuropharmacology* 2014, 79, 359–367.

Cruz-Trujillo, R., A. Avalos-Fuentes, C. Rangel-Barajas, F. Paz-Bermudez, A. Sierra, E. Escartin-Perez, J. Aceves, D. Erlij and B. Floran (2013). "D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat." *Neuropharmacology* 67: 370-378.

Damsma, G.; Bottema, T.; Westerink, B.H.; Tepper, P.G.; Dijkstra, D.; Pugsley, T.A.; Wikström, H. Pharmacological aspects of R-(+)-7-OH-DPAT, a putative dopamine D3 receptor ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 249, R9–R10.

David, H.N. Towards a Reconceptualization of Striatal Interactions Between Glutamatergic and Dopaminergic Neurotransmission and Their Contribution to the Production of Movements. *Curr. Neuropharmacol.* 2009, 7, 132–141.

Davila, V.; Yan, Z.; Craciun, L.C.; Logothetis, D.; Sulzer, D. D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J. Neurosci.* 2003, 23, 5693–5697.

De Camilli, P., D. Macconi and A. Spada (1979). "Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas." *Nature* 278(5701): 252-254.

De Mei, C., M. Ramos, C. Iitaka and E. Borrelli (2009). "Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors." *Curr Opin Pharmacol* 9(1): 53-58.

Deniau, J. M., P. Mailly, N. Maurice and S. Charpier (2007). "The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output." *Prog Brain Res* 160: 151-172.

Deniau, J. M., S. T. Kitai, J. P. Donoghue and I. Grofova (1982). "Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. An electrophysiological and morphological study." *Exp Brain Res* 47(1): 105-113.

Desce, J.; Godeheu, G.; Galli, T.; Artaud, F.; Cheramy, A.; Glowinski, J. I-Glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: Involvement of AMPA and N-methyl-d-aspartate receptors. *Neuroscience* 1992, 47, 333–339.

Di Chiara, G., M. L. Porceddu, M. Morelli, M. L. Mulas and G. L. Gessa (1979). "Evidence for a gabaergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat." *Brain Res* 176(2): 273-284.

Diaz, J., D. Levesque, C. H. Lammers, N. Griffon, M. P. Martres, J. C. Schwartz and P. Sokoloff (1995). "Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain." *Neuroscience* 65(3): 731-745.

Diaz, J.; Levesque, D.; Lammers, C.; Griffon, N.; Martres, M.-P.; Schwartz, J.-C.; Sokoloff, P. Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 1995, 65, 731–745.

Díaz, J.; Pilon, C.; Le Foll, B.; Gros, C.; Triller, A.; Schwartz, J.-C.; Sokoloff, P. Dopamine D3Receptors Expressed by All Mesencephalic Dopamine Neurons. *J. Neurosci.* 2000, 20, 8677–8684.

Dopico, J. G., T. Gonzalez-Hernandez, I. M. Perez, I. G. Garcia, A. M. Abril, J. O. Inchausti and M. Rodriguez Diaz (2006). "Glycine release in the substantia nigra: Interaction with glutamate and GABA." *Neuropharmacology* 50(5): 548-557.

Dray, A.; Oakley, N.R. Methiothepin and a 5-HT pathway to rat substantia nigra. *Cell. Mol. Life Sci.* 1977, 33, 1198–1200.

Elmhurst, J. L., Z. Xie, B. F. O'Dowd and S. R. George (2000). "The splice variant D3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization." *Brain Res Mol Brain Res* 80(1): 63-74.

Elsworth, J. D. and R. H. Roth (1997). "Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease." *Exp Neurol* 144(1): 4-9.

Erlj, D., J. Acosta-Garcia, M. Rojas-Marquez, B. Gonzalez-Hernandez, E. Escartin-Perez, J. Aceves and B. Floran (2012). "Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity." *Neuropharmacology* 62(2): 1111-1118.

- Fahn, S. (1987). "Systemic therapy of dystonia." *Can J Neurol Sci* 14(3 Suppl): 528-532.
- Féger, J.; Robledo, P. Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: Electrophysiological data. *Brain Res.* 1990, 518, 47–54. *Biomolecules* 2019, 9, 511 21 of 23.
- Florentini, C., C. Busi, E. Gorruso, C. Gotti, P. Spano and C. Missale (2008). "Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization." *Mol Pharmacol* 74(1): 59-69.
- Floran, B., J. Aceves, A. Sierra and D. Martinez-Fong (1990). "Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat." *Neurosci Lett* 116(1-2): 136-140.
- Floran, B., L. Floran, D. Erlij and J. Aceves (2004a). "Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus." *Neuropharmacology* 46(4): 497-503.
- Floran, B., L. Floran, D. Erlij and J. Aceves (2004b). "Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced [3H]GABA release in the rat subthalamic nucleus." *Eur J Pharmacol* 498(1-3): 97-102.
- Flores, G., J. J. Liang, A. Sierra, D. Martinez-Fong, R. Quirion, J. Aceves and L. K. Srivastava (1999). "Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography." *Neuroscience* 91(2): 549-556.
- Fujiyama, F.; Stephenson, F.A.; Bolam, J.P. Synaptic localization of GABA(A) receptor subunits in the substantia nigra of the rat: Effects of quinolinic acid lesions of the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 2002, 15, 1961–1975.
- Gale, K. Chronic blockade of dopamine receptors by antischizophrenic drugs enhances GABA binding in substantia nigra. *Nature* 1980, 283, 569–570. *Biomolecules* 2019, 9, 511 22 of 23.
- Galvan, A. and T. Wichmann (2008). "Pathophysiology of parkinsonism." *Clin Neurophysiol* 119(7): 1459-1474.
- Garcia, M.; Floran, B.; Arias-Montano, J.A.; Young, J.M.; Aceves, J. Histamine H-3 receptor activation selectively inhibits dopamine D-1 receptor-dependent H-3 GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 1997, 80, 241–249.
- Gasser, T., B. Muller-Myhsok, Z. K. Wszolek, A. Durr, J. R. Vaughan, V. Bonifati, G. Meco, B. Bereznoi, R. Oehlmann, Y. Agid, A. Brice and N. Wood (1997). "Genetic complexity and Parkinson's disease." *Science* 277(5324): 388-389; author reply 389.
- Gendreau, P.L.; Petitto, J.M.; Schnauss, R.; Frantz, K.J.; Van Hartesveldt, C.; Gariépy, J.-L.; Lewis, M.H. Effects of the putative dopamine D3 receptor antagonist PNU 99194A on motor behavior and emotional reactivity in C57BL/6J mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, 337, 147–155.

Gerfen, C. R. (2000). "Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways." *Trends Neurosci* 23(10 Suppl): S64-70.

Gerfen, C. R. and D. J. Surmeier (2011). "Modulation of striatal projection systems by dopamine." *Annu Rev Neurosci* 34: 441-466.

Gerfen, C. R., K. A. Keefe and E. B. Gauda (1995). "D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons." *J Neurosci* 15(12): 8167-8176.

Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. and D. R. Sibley (1990). "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons." *Science* 250(4986): 1429-1432.

Gerfen, C.R.; Surmeier, D.J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* 2011, 34, 441–466.

Ghez, C. (1991) Voluntary Movement. In: Principles of Neural Science, 3rd Edition, Chapter 38, Elsevier, New York, 609-625.

Giros, B., M. P. Martres, C. Pilon, P. Sokoloff and J. C. Schwartz (1991). "Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing." *Biochem Biophys Res Commun* 176(3): 1584-1592.

Giros, B., P. Sokoloff, M. P. Martres, J. F. Riou, L. J. Emorine and J. C. Schwartz (1989). "Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms." *Nature* 342(6252): 923-926.

Glase, S. A., H. C. Akunne, L. M. Georgic, T. G. Heffner, R. G. MacKenzie, P. J. Manley, T. A. Pugsley and L. D. Wise (1997). "Substituted [(4-phenylpiperazinyl)-methyl]benzamides: selective dopamine D4 agonists." *J Med Chem* 40(12): 1771-1772.

Gould, E., N. J. Woolf and L. L. Butcher (1989). "Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei." *Neuroscience* 28(3): 611-623.

Grace, A.; Bunney, B. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons—1. Identification and characterization. *Neuroscience* 1983, 10, 301–315.

Guihen, E. and W. T. O'Connor (2009). "Current separation and detection methods in microdialysis the drive towards sensitivity and speed." *Electrophoresis* 30(12): 2062-2075.

Guitart-Masip, M.; Johansson, B.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A.; Giménez-Llort, L. Divergent effect of the selective D3 receptor agonist pd-128,907 on locomotor activity in Roman high- and low-avoidance rats: Relationship to NGFI-A gene expression in the Calleja islands. *Psychopharmacology* 2008, 196, 39–49.

Gyertyán, I.; SÁghy, K. Effects of dopamine D3 receptor antagonists on spontaneous and agonist-reduced motor activity in NMRI mice and Wistar rats: Comparative study with nafadotride, U 99194A and SB 277011. *Behav. Pharmacol.* 2004, 15, 253–262.

Haadsma-Svensson, S.; Svensson, K. PNU-99194A: A preferential dopamine D3 receptor antagonist. *CNS Drug Rev.* 1998, 4, 42–53.

Hajos, M. and S. A. Greenfield (1993). "Topographic heterogeneity of substantia nigra neurons: diversity in intrinsic membrane properties and synaptic inputs." *Neuroscience* 55(4): 919-934.

Hattori, T., P. L. McGeer, H. C. Fibiger and E. G. McGeer (1973). "On the source of GABA-containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic autoradiographic and biochemical studies." *Brain Res* 54: 103-114.

Hatzipetros, T. and B. K. Yamamoto (2006). "Dopaminergic and GABAergic modulation of glutamate release from rat subthalamic nucleus efferents to the substantia nigra." *Brain Res* 1076(1): 60-67.

Hatzipetros, T.; Yamamoto, B.K. Dopaminergic and GABAergic modulation of glutamate release from rat subthalamic nucleus efferents to the substantia nigra. *Brain Res.* 2006, 1076, 60–67.

Henny, P.; Brown, M.T.C.; Northrop, A.; Faunes, M.; Ungless, M.; Magill, P.J.; Bolam, J.P. Structural correlates of heterogeneous in vivo activity of midbrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci.* 2012, 15, 613–619.

Hernandez, A., O. Ibanez-Sandoval, A. Sierra, R. Valdiosera, D. Tapia, V. Anaya, E. Galarraga, J. Bargas and J. Aceves (2006). "Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors." *J Neurophysiol* 96(6): 2877-2888.

Herrera-Marschitz, M., Z. B. You, M. Goiny, J. J. Meana, R. Silveira, O. V. Godukhin, Y. Chen, S. Espinoza, E. Pettersson, C. F. Loidl, G. Lubec, K. Andersson, I. Nylander, L. Terenius and U. Ungerstedt (1996). "On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis." *J Neurochem* 66(4): 1726-1735.

Holmes, A., J. E. Lachowicz and D. R. Sibley (2004). "Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes." *Neuropharmacology* 47(8): 1117-1134.

Huot, P., T. H. Johnston, J. B. Koprach, S. H. Fox and J. M. Brotchie (2013). "The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease." *Pharmacol Rev* 65(1): 171-222.

Ibanez-Sandoval, O., A. Hernandez, B. Floran, E. Galarraga, D. Tapia, R. Valdiosera, D. Erlij, J. Aceves and J. Bargas (2006). "Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors." *J Neurophysiol* 95(3): 1800-1811.

Iribe, Y., K. Moore, K. C. Pang and J. M. Tepper (1999). "Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro." *J Neurophysiol* 82(2): 925-933.

Iversen, S. D. and L. L. Iversen (2007). "Dopamine: 50 years in perspective." *Trends Neurosci* 30(5): 188-193.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000, 293, 1048–1062. Jackson, E.; Kelly, P.H. Nigral dopaminergic mechanisms in drug-induced circling. Brain Res. Bull. 1983, 11, 605–611.

Joseph, J.; Wang, Y.-M.; Miles, P.; Budygin, E.; Picetti, R.; Gainetdinov, R.; Caron, M.; Wightman, R.; Gainetdinov, R. Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D3 receptors. Neuroscience 2002, 112, 39–49.

Justice, J. B., Jr. (1993). "Quantitative microdialysis of neurotransmitters." J Neurosci Methods 48(3): 263-276.

Karpa, K. D., R. Lin, N. Kabbani and R. Levenson (2000). "The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors." Mol Pharmacol 58(4): 677-683.

Katada, T., G. M. Bokoch, J. K. Northup, M. Ui and A. G. Gilman (1984). "The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein." J Biol Chem 259(6): 3568-3577.

Kemp, J. M. and T. P. Powell (1971). "The synaptic organization of the caudate nucleus." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 262(845): 403-412.

Khan, Z. U., A. Gutierrez, R. Martin, A. Penafiel, A. Rivera and A. De La Calle (1998). "Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain." J Comp Neurol 402(3): 353-371.

Kho, C.M.; Ab Rahim, S.K.E.; Ahmad, Z.A.; Abdullah, N.S. A Review on Microdialysis Calibration Methods: The Theory and Current Related Efforts. Mol. Neurobiol. 2017, 54, 3506–3527.

Kilpatrick, I.; Starr, M.; Fletcher, A.; James, T.; MacLeod, N. Evidence for a GABAergic nigrothalamic pathway in the rat. Exp. Brain Res. 1980, 40, 55–61.

Kita, H. and S. T. Kitai (1987). "Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method." J Comp Neurol 260(3): 435-452.

Kita, H. and S. T. Kitai (1988). "Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations." Brain Res 447(2): 346-352.

Kiyatkin, E.A.; Rebec, G.V. Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. J. Neurophysiol. 1996, 75, 142–153.

Kling-Petersen, T.; Ljung, E.; Svensson, K. Effects on locomotor activity after local application of D3 preferring compounds in discrete areas of the rat brain. J. Neural Transm. 1995, 102, 209–220. Biomolecules 2019, 9, 511 23 of 23.

Kornhuber, J., J. S. Kim, M. E. Kornhuber and H. H. Kornhuber (1984). "The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantia nigra following frontal cortex ablation in the rat." Brain Res 322(1): 124-126.

Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag and P. C. Sternweis (1998). "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13." *Science* 280(5372): 2109-2111.

Kreiss, D. S., C. W. Mastropietro, S. S. Rawji and J. R. Walters (1997). "The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease." *J Neurosci* 17(17): 6807-6819.

Kreitzer, A. C. (2009). "Physiology and pharmacology of striatal neurons." *Annu Rev Neurosci* 32: 127-147.

L'Hirondel, M.; Cheramy, A.; Godeheu, G.; Artaud, F.; Saiardi, A.; Borrelli, E.; Glowinski, J. Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res.* 1998, 792, 253–262.

LaHoste, G. J., J. M. Swanson, S. B. Wigal, C. Glabe, T. Wigal, N. King and J. L. Kennedy (1996). "Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder." *Mol Psychiatry* 1(2): 121-124.

Leung, P. W., C. C. Lee, S. F. Hung, T. P. Ho, C. P. Tang, S. L. Kwong, S. Y. Leung, S. T. Yuen, F. Lieh-Mak, J. Oosterlaan, D. Grady, A. Harxhi, Y. C. Ding, H. C. Chi, P. Flodman, S. Schuck, M. A. Spence, R. Moyzis and J. Swanson (2005). "Dopamine receptor D4 (DRD4) gene in Han Chinese children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): increased prevalence of the 2-repeat allele." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B(1): 54-56.

Lew, J. Y., A. Garcia-Espana, K. Y. Lee, K. D. Carr, M. Goldstein, J. W. Haycock and E. Meller (1999). "Increased site-specific phosphorylation of tyrosine hydroxylase accompanies stimulation of enzymatic activity induced by cessation of dopamine neuronal activity." *Mol Pharmacol* 55(2): 202-209.

Liu, F. C. and A. M. Graybiel (1996). "Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum." *Neuron* 17(6): 1133-1144.

Liu, K., C. Bergson, R. Levenson and C. Schmauss (1994). "On the origin of mRNA encoding the truncated dopamine D3-type receptor D3nf and detection of D3nf-like immunoreactivity in human brain." *J Biol Chem* 269(46): 29220-29226.

Logothetis, D. E., Y. Kurachi, J. Galper, E. J. Neer and D. E. Clapham (1987). "The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart." *Nature* 325(6102): 321-326.

Ma, Y. C., J. Huang, S. Ali, W. Lowry and X. Y. Huang (2000). "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins." *Cell* 102(5): 635-646.

Maina, F.K.; Mathews, T.A. A functional fast scan cyclic voltammetry assay to characterize dopamine D2 and D3 autoreceptors in the mouse striatum. *ACS Chem. Neurosci.* 2010, 1, 450–462.

Marien, M., J. Brien and K. Jhamandas (1983). "Regional release of [3H]dopamine from rat brain in vitro: effects of opioids on release induced by potassium, nicotine, and L-glutamic acid." *Can J Physiol Pharmacol* 61(1): 43-60.

Martin, G.; Papp, N.; Bacino, C. Contralateral turning evoked by the intranigral microinjection of muscimol and other GABA agonists. *Brain Res.* 1978, 155, 297–312.

Matuszewich, L. and B. K. Yamamoto (1999). "Modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra." *Synapse* 32(1): 29-36.

Mayorga, A.J.; Trevitt, J.T.; Conlan, A.; Gianutsos, G.; Salamone, J.D. Striatal and nigral D1 mechanisms involved in the antiparkinsonian effects of SKF 82958 (APB): Studies of tremulous jaw movements in rats. *Psychopharmacology* 1999, 143, 72–81.

Mengod, G., M. Pompeiano, M. I. Martinez-Mir and J. M. Palacios (1990). "Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites." *Brain Res* 524(1): 139-143.

Millan, M.J.; Gobert, A.; Newman-Tancredi, A.; Lejeune, F.; Cussac, D.; Rivet, J.M.; Audinot, V.; Dubuffet, T.; Lavielle, G. S33084, a novel, potent, selective, and competitive antagonist at dopamine D(3)-receptors: I. Receptorial, electrophysiological and neurochemical profile compared with GR218,231 and L741,626. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 293, 1048–1062.

Mintz, I., C. Hammond, B. Guibert and V. Leviel (1986). "Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra." *Brain Res* 376(2): 406-408.

Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." *Physiol Rev* 78(1): 189-225.

Mohr, P., M. Decker, C. Enzensperger and J. Lehmann (2006). "Dopamine/serotonin receptor ligands. 12(1): SAR studies on hexahydro-dibenz[d,g]azecines lead to 4-chloro-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]azecin-3-ol, the first picomolar D5-selective dopamine-receptor antagonist." *J Med Chem* 49(6): 2110-2116.

Monsma, F. J., Jr., L. D. McVittie, C. R. Gerfen, L. C. Mahan and D. R. Sibley (1989). "Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing." *Nature* 342(6252): 926-929.

Mrzljak, L., C. Bergson, M. Pappy, R. Huff, R. Levenson and P. S. Goldman-Rakic (1996). "Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain." *Nature* 381(6579): 245-248.

Nava-Asbell, C., F. Paz-Bermudez, D. Erlij, J. Aceves and B. Floran (2007). "GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata." *Neuropharmacology* 53(5): 631-637.

Neumeyer, J. Receptor affinities of dopamine D1 receptor-selective novel phenylbenzazepines. *Eur. J. Pharmacol.* 2003, 474, 137–140.

Neve, K. A., J. K. Seamans and H. Trantham-Davidson (2004). "Dopamine receptor signaling." *J Recept Signal Transduct Res* 24(3): 165-205.

Obeso, J. A., C. Marin, C. Rodriguez-Oroz, J. Blesa, B. Benitez-Temino, J. Mena-Segovia, M. Rodriguez and C. W. Olanow (2008a). "The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations." *Ann Neurol* 64 Suppl 2: S30-46.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F. J. Blesa, J. Guridi, C. Marin and M. Rodriguez (2008b). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." *Mov Disord* 23 Suppl 3: S548-559.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, M. Rodriguez, J. Arbizu and J. M. Gimenez-Amaya (2002). "The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms." *News Physiol Sci* 17: 51-55.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, M. Rodriguez, J. L. Lanciego, J. Artieda, N. Gonzalo and C. W. Olanow (2000). "Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease." *Trends Neurosci* 23(10 Suppl): S8-19.

Ouagazzal, A.-M.; Creese, I. Intra-accumbens infusion of D3 receptor agonists reduces spontaneous and dopamine-induced locomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000, 67, 637-645.

Page, K. M., C. Canti, G. J. Stephens, N. S. Berrow and A. C. Dolphin (1998). "Identification of the amino terminus of neuronal Ca²⁺ channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation." *J Neurosci* 18(13): 4815-4824.

Parent, A. and L. N. Hazrati (1995a). "Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop." *Brain Res Brain Res Rev* 20(1): 91-127.

Parent, A. and L. N. Hazrati (1995b). "Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry." *Brain Res Brain Res Rev* 20(1): 128-154.

Paxinos, G. and C. Watson (1998). *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Incorporated.

M.; Giorgi, O.; Ongini, E.; Mele, S.; Biggio, G. 3H-SCH 23390 binding sites in the rat substantia nigra: Evidence for a presynaptic localization and innervation by dopamine. *Life Sci.* 1986, 39, 321-328.

Pazos, A., A. Probst and J. M. Palacios (1987). "Serotonin receptors in the human brain--IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors." *Neuroscience* 21(1): 123-139.

Perkins, M. N. and T. W. Stone (1980). "Subthalamic projections to the globus pallidus: an electrophysiological study in the rat." *Exp Neurol* 68(3): 500-511.

Pierce, K. L., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 639-650.

Pinkerton, T. C. (1991). "High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection." *J Chromatogr* 544(1-2): 13-23.

Pitcher, J. A., N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz (1998). "G protein-coupled receptor kinases." *Annu Rev Biochem* 67: 653-692.

Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe and R. L. Nussbaum (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science* 276(5321): 2045-2047.

Pritchard, L.M.; Newman, A.H.; McNamara, R.K.; Logue, A.D.; Taylor, B.; Welge, J.A.; Xu, M.; Zhang, J.; Richtand, N.M. The dopamine D3 receptor antagonist NGB 2904 increases spontaneous and amphetamine-stimulated locomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007, 86, 718–726.

Pugsley, T. A., M. D. Davis, H. C. Akunne, R. G. MacKenzie, Y. H. Shih, G. Damsma, H. Wikstrom, S. Z. Whetzel, L. M. Georgic, L. W. Cooke and et al. (1995). "Neurochemical and functional characterization of the preferentially selective dopamine D3 agonist PD 128907." *J Pharmacol Exp Ther* 275(3): 1355-1366.

Qin, N., D. Platano, R. Olcese, E. Stefani and L. Birnbaumer (1997). "Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16): 8866-8871.

Quiroz-Gonzalez, S., R. E. Escartin-Perez, F. Paz-Bermudez, B. Segura-Alegria, C. Reyes-Legorreta, J. C. Guadarrama-Olmos, B. Floran-Garduno and I. Jimenez-Estrada (2013). "Endogenous content and release of [(3)H]-GABA and [(3)H]-glutamate in the spinal cord of chronically undernourished rat." *Neurochem Res* 38(1): 23-31.

Ramanathan, S.; Tkatch, T.; Atherton, J.F.; Wilson, C.J.; Bevan, M.D. D2-Like Dopamine Receptors Modulate SKCa Channel Function in Subthalamic Nucleus Neurons Through Inhibition of Cav2.2 Channels. *J. Neurophysiol.* 2008, 99, 442–459.

Rassoulpour, A.; Wu, H.-Q.; Ferre, S.; Schwarcz, R. Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *J. Neurochem.* 2005, 93, 762–765.

Reavill, C.; Taylor, S.G.; Wood, M.D.; Ashmeade, T.E.; Austin, N.; Avenell, K.Y.; Boyfield, I.; Branch, C.L.; Cilia, J.; Coldwell, M.C.; et al. Pharmacological actions of a novel, high-affinity, and selective human dopamine D(3) receptor antagonist, SB-277011-A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 294, 1154–1165.

Rice, M.E.; Cragg, S.J. Dopamine Spillover after Quantal Release: Rethinking Dopamine Transmission in the Nigrostriatal Pathway. *Brain Res. Rev.* 2008, 58, 303–313.

Riederer, P., K. W. Lange, J. Kornhuber and W. Danielczyk (1992). "Glutamatergic-dopaminergic balance in the brain. Its importance in motor disorders and schizophrenia." *Arzneimittelforschung* 42(2A): 265-268.

Rinvik, E. and I. Grofova (1970). "Observations on the fine structure of the substantia nigra in the cat." *Exp Brain Res* 11(3): 229-248.

Robertson, G.; Robertson, H. Evidence that L-dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanisms. *J. Neurosci.* 1989, 9, 3326–3331.

Rodbell, M., L. Birnbaumer, S. L. Pohl and H. M. Krans (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action." *J Biol Chem* 246(6): 1877-1882.

Rodriguez, M.; Loya, S.; Escartín, E.; Ayala, V.; Paz, F.; Erlij, D.; Floran, B. D3 receptor blockade increases dopamine, glutamate and GABA levels in the substantia nigra reticulata and increases locomotor activity. Presented at SFN Congress, Washington, DC, USA, 2017.

Romo-Parra, H., J. Aceves and R. Gutierrez (2005). "Tonic modulation of inhibition by dopamine D4 receptors in the rat hippocampus." *Hippocampus* 15(2): 254-259.

Rosales, M. G., D. Martinez-Fong, R. Morales, A. Nunez, G. Flores, J. L. Gongora-Alfaro, B. Floran and J. Aceves (1997). "Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study." *Neuroscience* 80(3): 803-810.

Rosales, M. G., G. Flores, S. Hernandez, D. Martinez-Fong and J. Aceves (1994). "Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat." *Brain Res* 645(1-2): 335-337.

Saitoh, K., T. Isa and K. Takakusaki (2004). "Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats." *Eur J Neurosci* 19(9): 2399-2409.

Santiago, M. and B. H. Westerink (1991). "The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autoreceptors." *Eur J Pharmacol* 204(1): 79-85.

Santini, F., I. Gaidarov and J. H. Keen (2002). "G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery." *J Cell Biol* 156(4): 665-676.

Sautel, F.; Gri_on, N.; Sokolo_, P.; Schwartz, J.C.; Launay, C.; Simon, P.; Costentin, J.; Schoenfelder, A.; Garrido, F.; Mann, A. Nafadotride, a potent preferential dopamine D3 receptor antagonist, activates locomotion in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 275, 1239–1246.

Savasta, M., A. Dubois and B. Scatton (1986b). "Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390." *Brain Res* 375(2): 291-301.

Savasta, M., A. Dubois, J. Benavides and B. Scatton (1986a). "Different neuronal location of [3H]SCH 23390 binding sites in pars reticulata and pars compacta of the substantia nigra in the rat." *Neurosci Lett* 72(3): 265-271.

Seeman, P. and H. H. Van Tol (1994). "Dopamine receptor pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* 15(7): 264-270.

Shen, K. Z. and S. W. Johnson (2012). "Regulation of polysynaptic subthalamonigral transmission by D2, D3 and D4 dopamine receptors in rat brain slices." *J Physiol* 590(Pt 10): 2273-2284.

Shen, K.-Z.; Johnson, S.W. Regulation of polysynaptic subthalamonigral transmission by D2, D3 and D4 dopamine receptors in rat brain slices. *J. Physiol.* 2012, 590, 2273–2284. Sibley, D.R.; Ariano, M.A. Dopamine receptor distribution in the rat CNS: Elucidation using anti-peptide antisera directed against D1A and D3 subtypes. *Brain Res.* 1994, 649, 95–110.

Shin, R. M., M. Masuda, M. Miura, H. Sano, T. Shirasawa, W. J. Song, K. Kobayashi and T. Aosaki (2003). "Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons." *J Neurosci* 23(37): 11662-11672.

Sibley, D. R. (1999). "New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 313-341.

Sidhu, A. (1998). "Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins: Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling." *Mol Neurobiol* 16(2): 125-134.

Smith, I.D.; Grace, A.A. Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. *Synapse* 1992, 12, 287–303.

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

Stanwood, G.D.; Artymyshyn, R.P.; Kung, M.P.; Kung, H.F.; Lucki, I.; Mcgonigle, P. Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [(125)I]7-OH-PIPAT: Evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 295, 1223–1231.

Starke, K.; Göthert, M.; Kilbinger, H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 1989, 69, 864–989.

Starr, M.S.; Starr, B.S. Circling evoked by intranigral SKF 38393: A GABA-mediated D-1 response? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989, 32, 849–851.

Stewart, J.; Vezina, P. Microinjections of Sch-23390 into the ventral tegmental area and substantia nigra pars reticulata attenuate the development of sensitization to the locomotor activating effects of systemic amphetamine. *Brain Res.* 1989, 495, 401–406.

Strahlendorf, H.K.; Barnes, C.D. Control of substantia nigra pars reticulata neurons by the nucleus accumbens. *Brain Res. Bull.* 1983, 11, 259–263.

Surmeier DJ, Kitai ST. D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Progress in Brain Research.* 1993, 99: 309-24.

Surmeier, D.J.; Eberwine, J.; Wilson, C.J.; Cao, Y.; Stefani, A.; Kitai, S.T. Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 89, 10178–10182.

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

Tang, L.; Todd, R.D.; O'Malley, K.L. Dopamine D2 and D3 receptors inhibit dopamine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 270, 475–479. *Biomolecules* 2019, 9, 511 20 of 23.

Trevitt, J.T.; Carlson, B.B.; Nowend, K.; Salamone, J.D. Substantia nigra pars reticulata is a highly potent site of action for the behavioral effects of the D1 antagonist SCH 23390 in the rat. *Psychopharmacology* 2001, 156, 32–41.

Trevitt, T.; Carlson, B.; Correa, M.; Keene, A.; Morales, M.; Salamone, J. Interactions between dopamine D1 receptors and gamma-aminobutyric acid mechanisms in substantia nigra pars reticulata of the rat: Neurochemical and behavioral studies. *Psychopharmacology* 2002, 159, 229–237.

Walaas, I.; Fonnum, F. Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* 1980, 5, 63–72.

Waters, N.; Svensson, K.; Haadsma-Svensson, S.R.; Smith, M.W.; Carlsson, A. The dopamine D3-receptor: A postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J. Neural. Transm.* 1993, 94, 11–19.

Westerink, B.H.C.; Santiago, M.; De Vries, J.B.; Vries, J. In vivo evidence for a concordant response of terminal and dendritic dopamine release during intranigral infusion of drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1992, 346, 637–643.

Wichmann, T., and DeLong, M. R. (2007). Anatomy and physiology of the basal ganglia: relevance to Parkinson's disease and related disorders. *Handb. Clin. Neurol.* 83, 1–18.

Windels, F.; Kiyatkin, E. GABAergic mechanisms in regulating the activity state of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* 2006, 140, 1289–1299.

Windels, F.; Kiyatkin, E.A. GABA, Not Glutamate, Controls the Activity of Substantia Nigra Reticulata Neurons in Awake, Unrestrained Rats. *J. Neurosci.* 2004, 24, 6751–6754.

Wittmann, M.; Marino, M.J.; Bradley, S.R.; Conn, P.J. Activation of Group III mGluRs Inhibits GABAergic and Glutamatergic Transmission in the Substantia Nigra Pars Reticulata. *J. Neurophysiol.* 2001, 85, 1960–1968.

Yin and Knowlton, 2006 H.H. Yin, B.J. Knowlton. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7 (2006), pp. 464-476.

Yung, K.; Bolam, J.P.; Smith, A.; Hersch, S.; Ciliax, B.; Levey, A.; Smith, D. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: Light and electron microscopy. *Neuroscience* 1995, 65, 709–730.

Zapata, A.; Chefer, V.I.; Shippenberg, T.S.; Denoroy, L. Detection and quantification of neurotransmitters in dialysates. *Curr. Protoc. Neurosci.* 2009, 48, 7.4.1–7.4.30.