



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Control de la liberación de [³H]-glutamato por los receptores
dopaminérgicos en la terminal subtálamo-nigral de la rata: importancia
de los receptores D₃”**

Tesis que presenta:

M. en C. Laura Jesús Briones Lizardi

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Neurobiología celular y molecular

Directores de Tesis

Dr. Jorge Aceves Ruiz

Dr. Benjamín Florán Garduño

Ciudad de México Noviembre, 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a Isaac y a mis amigos; por el amor, apoyo y amistad que me han brindado durante este tiempo.

Al Dr. Benjamín Florán y Dr. Jorge Aceves por ser mis tutores y guiarme en este proceso.

Al Dr. José Antonio Arias, Dr. Rodolfo Delgado, Dr. Ricardo Félix y Dr. Hernán por ser mis asesores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo septiembre 2013/agosto 2017.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Enfermedad de Parkinson	4
1.2 Dopamina y sus receptores	4
1.3 Organización de los ganglios basales	6
1.4 Efecto de la dopamina en los GB y la EP	7
1.5 Importancia de la SNr en los GB y en el control motor.	8
1.6 Expresión de receptores a dopamina en la SNr.	9
1.7 Efecto de la activación de receptores <i>D₁-like</i> presinápticos sobre la liberación de GABA en la SNr.	10
1.8 Efecto de la activación de receptores <i>D₁-like</i> subtálamo-nigrales sobre la liberación de glutamato en la SNr.	11
1.9 Efecto de la activación de receptores <i>D₂-like</i> subtálamo-nigrales sobre la liberación de glutamato en la SNr.	12
1.10 Los agonistas del receptor <i>D₃</i> recuperan la actividad motora en modelos con la EP.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVO GENERAL.....	18
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1 Animales.....	20
6.2 Administración de reserpina	20
6.3 Preparación de rebanadas.....	20
6.4 Liberación de [³ H]-glutamato	21
6.5 Determinación de la radioactividad.....	21
6.6 Lesión con 6-OHDA.....	22
6.7 Preparación de homogenados para coimmunoprecipitación	22

6.8	Coinmunoprecipitación	23
6.9	<i>Western-Blot</i>	24
6.10	Análisis estadístico	24
7.	RESULTADOS	25
7.1	La dopamina controla liberación de [³ H]-glutamato en la SNr a través de receptores <i>D_{1-like}</i> y <i>D_{2-like}</i>	25
7.2	La dopamina incrementa la liberación de [³ H]-glutamato mediante la activación de receptores <i>D_{1-like}</i>	26
7.3	Contribución relativa de los receptores <i>D₂</i> , <i>D₃</i> y <i>D₄</i> al efecto inhibitorio de la dopamina.....	29
7.4	Efecto de la activación de receptores <i>D_{1-like}</i> , <i>D₂</i> y <i>D₃</i> con agonistas selectivos.....	31
7.5	Interacción de receptores dopaminérgicos	34
7.6	La dopamina endógena controla la liberación de glutamato a través de receptores <i>D_{1-like}</i> y <i>D_{2-like}</i>	36
7.7	El receptor <i>D₃</i> disminuye la liberación de [³ H]-glutamato por una vía diferente a la AC-AMPC-PKA.....	37
7.8	Participación de los canales de calcio sobre el efecto de PD 128,907.....	39
7.9	El receptor <i>D₃</i> señala mediante la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G	40
7.10	La CaMKII no modula el efecto del receptor <i>D₃</i>	42
7.11	La denervación potencia el efecto del receptor <i>D₃</i>	43
8.	DISCUSIÓN	45
9.	CONCLUSIONES.....	61
10.	BIBLIOGRAFÍA	62

ABREVIACIONES

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AC	Adenilato ciclasa
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico
AVT	Área Ventral Tegmental
CaMKII	Cinasa de calcio y calmodulina II
DHK	Ácido dihidrokaínico
EP	Enfermedad de Parkinson
EPSCs	Corrientes postsinápticas excitatorias
GABA	Ácido gamma amino butírico
GB	Ganglios basales
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
L-Dopa	L-3,4 dihidroxifenilalanina
MFB	Haz medial del cerebro anterior (<i>medial forebrain bundle</i>)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
NST	Núcleo subtálmico
PKA	Proteína cinasa A
PLC β	Fosfolipasa C beta
SNc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNr	Sustancia nigra <i>pars reticulata</i>
Sol. KH	Solución Krebs-Henseleit

RESUMEN

La sustancia nigra *pars reticulata* es el núcleo de salida de los ganglios basales, controla los núcleos premotores del tálamo y por tanto el movimiento. Los receptores presinápticos dopaminérgicos *D₁-like* y *D₂-like* subtálamo-nigrales regulan el disparo de las neuronas nigrales al modular la liberación de glutamato. La contribución relativa de cada subtipo de receptor en la liberación de este neurotransmisor no ha sido estudiada. Esto es importante, ya que la prevalencia de un efecto inhibitorio o estimulador determina la frecuencia de disparo de las neuronas nigrales facilitando o inhibiendo respectivamente el movimiento. En el presente trabajo, se evaluó la contribución relativa de los subtipos de receptores dopaminérgicos en el control de la liberación de glutamato. Para ello utilizamos la liberación de [³H]-glutamato inducida por alto K⁺ en rebanadas de sustancia nigra reticulada de ratas reserpinizadas y sin reserpinizar. Encontramos que los receptores *D₁-like* y *D₃* contribuyen en gran medida a la liberación; los receptores *D₂* lo hacen de forma modesta y los receptores *D₄* no participan, siendo los receptores *D₃*, los que son activados con mayor potencia por la dopamina. Debido a la importancia clínica del receptor *D₃* (los agonistas de este receptor disminuyen la sintomatología en pacientes y modelos de la enfermedad de Parkinson) y al efecto encontrado en la liberación; dilucidamos su vía de señalización utilizando ratas reserpinizadas y si la denervación modificaba su función en rebanadas de sustancia nigra lesionadas con 6-OHDA. Encontramos que este receptor disminuye la liberación mediante la inhibición de canales de calcio de tipo N, a través de la subunidad βγ de la proteína G y observamos que la denervación potencia su efecto. Estos resultados sugieren diferencias en el control de la liberación de glutamato por los diferentes receptores dopaminérgicos en la sustancia reticulada, lo que contribuye a explicar el efecto de la dopamina y sus agonistas en el control motor, en particular los del receptor *D₃* en modelos y pacientes con la enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

The substantia nigra *pars reticulata* is the output station in basal ganglia and controls the premotor nuclei of the thalamus and therefore the movement. D₁-like and D₂-like dopaminergic presynaptic *receptors* regulate nigral neurons by modulating glutamate release. The relative contribution of each receptor subtype in the release of this neurotransmitter has not been studied. This is important, since the prevalence of an inhibitory or stimulatory effect determines the firing frequency of nigral neurons and thereby the movement. In the present work, the relative contribution of subtypes of dopamine receptors in the control of glutamate release was evaluated. To this end, we analysed the release of [³H]-glutamate induced by high K⁺ in slices of substantia nigra *pars reticulata* from reserpinized and non-reserpinized rats. We found a significant control of release by D₁-like and D₃ receptors, a modest effect of D₂ receptor and D₄ receptors do not participate. Dopamine showed more potency for D₃ receptors. Subsequently, due to the clinical importance of the D₃ receptor (agonists of this receptor alleviate the symptomatology in patients with Parkinson's disease and animal models) and the effect found in the release; we studied its signalling pathway using reserpinized rats and if denervation modified its function, using slices from rats lesioned with 6-OHDA. It was found that this receptor decreases glutamate release by inhibiting N-type calcium channels via the βγ subunit of the G protein, observing that denervation enhances its effect. These results suggest differences in the control of glutamate release by the different dopaminergic receptors in the substantia nigra *pars reticulata*, which could help explain the effect of dopamine and its agonists on motor control, particularly the effect of the D₃ receptor in models and patients with Parkinson's disease.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo con mayor incidencia nivel mundial, se calcula que afecta del 2 al 3% de la población mayor a 65 años (Poewe *et al.*, 2017). Este padecimiento se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNc) (Langston 2006), lo que produce una disminución en los niveles de dopamina en diferentes núcleos de los ganglios basales (GB): estriado, globo pálido interno (GPi) y externo (GPe), núcleo subtálamico (NST) y sustancia nigra *pars reticulata* (SNr). Lo anterior trae consigo la aparición de los síntomas cardinales de la enfermedad: acinesia o bradicinesia, la rigidez y el temblor (Hughes *et al.*, 1992).

1.2 Dopamina y sus receptores

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y algunas regiones periféricas. En el cerebro, la dopamina participa en el control del movimiento, cognición, emociones, memoria, recompensa y regulación de la liberación de prolactina. La dopamina señala a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). En mamíferos, se conocen cinco subtipos divididos en dos familias de acuerdo a su estructura y respuesta biológica. La familia *D₁-like* que incluye a los receptores *D₁* y *D₅*; mientras que la familia *D₂-like* está conformada por los receptores *D₂*, *D₃* y *D₄*. Típicamente, la familia *D₁-like* activa a la adenilato ciclasa favoreciendo la producción de AMPc y activación de la PKA. Por otro lado, la familia *D₂-like* inhibe la adenilato ciclasa, disminuye la formación de cAMP y modula la actividad de la PKA (Rangel-Barajas *et al.*, 2015).

Para el estudio de los diferentes subtipos de receptores se emplean diversos agonistas/antagonistas capaces de discriminar entre familias y más recientemente se han desarrollado fármacos que distinguen entre los diferentes subtipos de receptores (Tabla 1). Sin embargo, hasta la fecha no se han podido obtener compuestos selectivos para el receptor D₅, por lo que los receptores D₁ y D₅, suelen estudiarse como receptores D_{1-like}. De manera general, la afinidad de la dopamina (ligando natural) por los diferentes receptores es del orden micromolar por el receptor D_{1-like} y de nanomolar por los receptores D_{2-like}, en particular por el receptor D₃.

Tabla 1. Lista de afinidades (K_i, en nM) de agonistas/antagonistas de receptores dopaminérgicos. La variabilidad entre los valores se debe al tipo celular en el que se llevaron a cabo los experimentos o bien al estado de afinidad del receptor.

Compuesto	Subtipo de receptor				
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
<i>Agonistas</i>					
Dopamina ^a	0.9-2400	<0.9-240	2.8-274	4-27	28-450
Quinpirole ^b	1900		4.8-576	5.1-24	30-46
SKF 38393 ^c	1-150	0.5-100	150-9560	5000	1000-1800
Sumanirole ^d	>7140		9.0	1940	>2190
PD 128,907 ^e	> 10000		1200	1	7000
<i>Antagonistas</i>					
SCH 23390 ^f	0.11-0.35	0.11-0.54	270-1100	314-800	3000-3560
GR 103,691 ^g	400		40	0.32	
L 741,626 ^h	794	630	6.3	63	316
L 745,870 ⁱ	>10000		960	2300	0.43

a), b), c), f) Vallone *et al.*, 2000, revisión (sistema de expresión no indicado).

d) Mc Call *et al.*, 2005. Determinado en células CHO y HEK293 expresando receptores D₂, D₃ o D₄ y membranas estriatales expresando el receptor D₁.

e) Akunne *et al.*, 1995. Determinado en células CHO expresando receptores D₂, D₃ o D₄ y membranas estriatales expresando el receptor D₁.

g) Murray *et al.*, 1995b. Determinado en células Ltk⁻ expresando receptores hD_{2s}, células CHO expresando receptores hD₃ y tejido de estriado expresando rD₁.

h) Millan *et al.*, 2000. Determinado en células CHO expresando al receptor hD₃ o hD₄, tejido de estriado expresando rD₂, células L expresando al receptor hD₁ y células GH4 expresando hD₅.

i) Kulagowski *et al.*, 1996. Determinado en células CHO expresando hD₂ o hD₃, células HEK293 expresando receptores D₄.

1.3 Organización de los ganglios basales

Los GB son un conjunto de núcleos subcorticales que regulan funciones como el movimiento de tipo voluntario y la cognición. Siendo el movimiento el más estudiado. Los GB controlan el movimiento voluntario a través del circuito corteza-GB-tálamo-corteza (Albin *et al.*, 1989). En este circuito (Fig. 1A), la corteza envía la información al núcleo de entrada de los ganglios, el estriado, éste a su vez la envía a los núcleos de salida (GPi y SNr) mediante dos vías: una vía directa y otra indirecta. El GPi y SNr establecen sinapsis inhibitorias vía GABA con neuronas glutamatérgicas del tálamo, las cuales finalmente cierran el circuito activando la corteza (Albin *et al.*, 1989). En la vía directa neuronas GABAérgicas proyectan sobre los núcleos de salida disminuyendo su actividad. Esta acción desinhibe los núcleos premotores del tálamo trayendo consigo la excitación de la corteza motora y la iniciación del movimiento. Por otro lado, en la vía indirecta, las neuronas estriatales proyectan sobre el GPe, éste a su vez establece sinapsis GABAérgicas con el NST, el cual finalmente enviará proyecciones glutamatérgicas a los núcleos de salida produciendo un incremento en la actividad de los mismos, lo que inhibirá la actividad del tálamo y la excitación de la corteza, oponiéndose a la generación del movimiento (Alexander y Crutcher, 1990; Chevalier y Deniau 1990). La activación de ambas vías tiene efectos opuestos sobre el movimiento, la vía directa lo facilita mientras que la vía indirecta lo impedirá (Obeso *et al.*, 2008). Este conflicto en la generación del movimiento es resuelto por la dopamina.

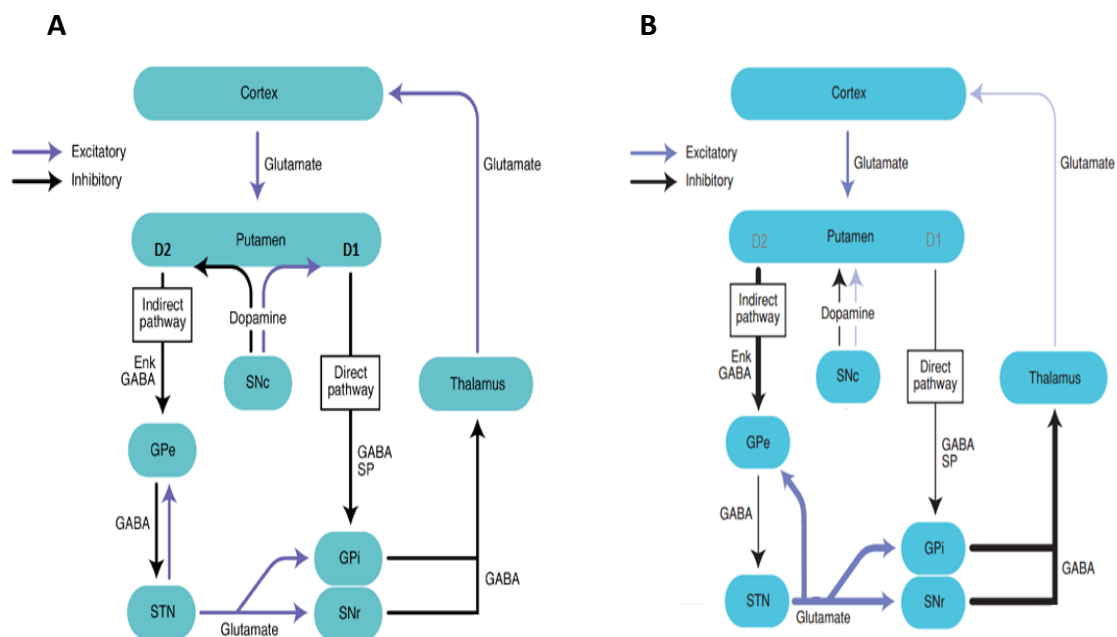


Fig. 1. Organización funcional clásica de los GB en el estado A. normal y B. Parkinsónico. **A.** El estriado se comunica con los núcleos de salida: globo pálido interno (GPI) y sustancia nigra *pars reticulata* (SNr), a través de una vía directa y de una indirecta que hace relevo en el globo pálido externo (GPe) y núcleo subtálamico (NST). La dopamina activa receptores D₁ en neuronas estriatales de la vía directa y receptores D₂ expresados en neuronas de la vía indirecta. **B.** En la enfermedad de Parkinson, debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNc), disminuye la activación de la vía directa y se facilita la de la vía indirecta por la falta de activación de los receptores D₂. Lo que finalmente, incrementa la actividad del NST sobre los núcleos de salida, por la disminución del disparo de las neuronas del GPe, que llevará en última instancia a la sobre-inhibición de neuronas tálamo-corticales. Imágenes modificadas de Simon *et al.*, 2003.

1.4 Efecto de la dopamina en los GB y la EP

La SNc utiliza como neurotransmisor a la dopamina, la cual ejerce sus efectos dependiendo del receptor al cual se una. En el estriado, las neuronas de la vía directa poseen principalmente receptores D₁, la dopamina producirá un incremento en la actividad de las mismas y por lo tanto facilitará la vía directa (Fig. 1A). Mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan receptores D₂ cuya activación produce disminución de la liberación de GABA (Obeso *et al.*, 2000; Gerfen y Surmeier, 2011). Esto permite que el GPe

incremente su disparo, inhibiendo la actividad del NST. El resultado final de la acción de la dopamina sobre los receptores estriatales es disminuir el disparo de los núcleos de salida mediante el incremento de la actividad de la vía directa, reduciendo la inhibición sobre las neuronas tálamo-corticales y facilitando el movimiento. En la EP disminuyen drásticamente los niveles de dopamina en los GB, afectando principalmente la vía nigroestriatal y causando un desbalance en las vías directa e indirecta (Fig. 1B). Reduciendo la actividad de la vía directa y favoreciendo la de la vía indirecta, lo que finalmente lleva al incremento en la actividad de los núcleos de salida, dificultando que se lleve a cabo el movimiento.

1.5 Importancia de la SNr en los GB y en el control motor.

La SNr tiene un papel determinante dentro de la estructura de los ganglios basales: es un núcleo de salida, cuyas neuronas GABAérgicas tienen disparo tónico y hacen sinapsis con núcleos premotores del tálamo controlando el comportamiento motor (Robertson 1992). Además, la SNr es un centro integrador de la información ya que sus neuronas GABAérgicas reciben aferencias inhibitorias y excitatorias (Zhou y Lee, 2011). La entrada inhibitoria es GABAérgica que proviene principalmente del estriado y del GPe, mientras que la excitatoria es glutamatérgica y proviene principalmente del NST (Parent y Hazrati 1995). También se sabe que la SNc libera dopamina vía dendrítica directamente sobre la SNr (Geffen *et al.*, 1976) y puede controlar la liberación de glutamato y GABA mediante la activación de receptores dopaminérgicos presinápticos (Rosales *et al.*, 1997; Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006).

1.6 Expresión de receptores a dopamina en la SNr.

En la SNr se expresan todos los subtipos de receptores dopaminérgicos, *D₁-like*, *D₂*, *D₃* y *D₄* (Fig. 2); sin embargo, se cree que tienen un origen externo, ya que el ARNm de estos receptores no se ha localizado en este núcleo. Pero si en diferentes tipos neuronales que envían proyecciones a la SNr (Fig. 3): las neuronas estriado-nigrales poseen la proteína y el ARNm de los receptores *D₁-like* y *D₃* (Fig. 3A) (Sokoloff *et al.*, 2006). En neuronas del NST se ha encontrado ARNm y la proteína de los receptores *D₁-like*, *D₂* y *D₃* (Fig. 3B) (Flores *et al.*, 1999; Ramanathan *et al.*, 2008) Mientras que la presencia de los receptores *D₄* en las neuronas pálido-nigrales se ha demostrado a partir de la evaluación de sus efectos sobre la transmisión GABAérgica en la SNr (Fig. 3C) (Acosta-García *et al.*, 2009) y técnicas como *binding* e inmunohistoquímica.

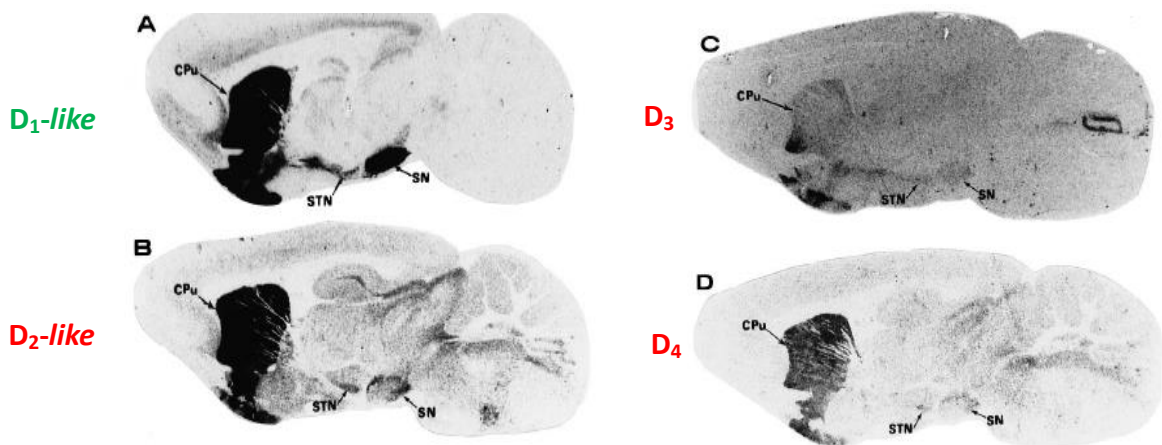


Fig. 2. Fotografías de cerebro de rata que ilustran los sitios de unión o *binding* de los receptores dopaminérgicos. *Binding* para los receptores. **A.** *D₁-like* con [³H]-SCH 23390. **B.** *D₂-like* con [³H]-YM-09151-2. **C.** *D₃* con [³H]-7-OH-DPAT. **D.** *D₄* con [³H]-YM-09151-2 en la presencia de raclopride. En las imágenes se observa la presencia de todos los subtipos de receptores en la sustancia nigra (SN). Imagen modificada de Flores *et al.*, 1999.

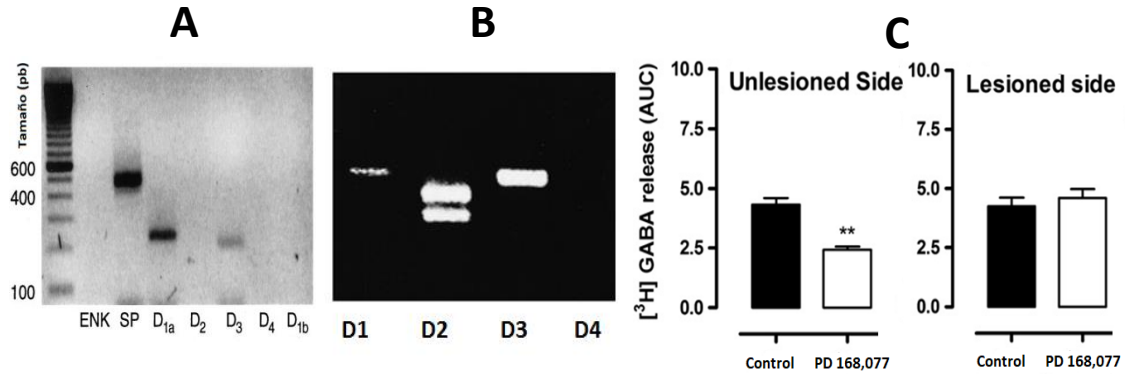


Fig. 3. Los núcleos que envían proyecciones a la SNr poseen receptores a dopamina. **A.** El ARNm del receptor D₃ se coexpresa con el del receptor D₁ en neuronas del estriado positivas a sustancia P, se utilizó 1/5 del ADNc total obtenido por RT-PCR de una sola célula y se amplificó nuevamente con *primers* para los receptores D_{1a}, D_{1b}, D₂, D₃, D₄, encefalina (ENK) y sustancia P (SP). **B.** Amplificados de los productos obtenidos por RT-PCR del subtálamo (homogenado total), utilizando *primers* para los receptores D₁, D₂, D₃, D₄ y visualizados con bromuro de etidio. **C.** Experimentos de liberación de [³H]-GABA llevados a cabo en rebanadas de SNr de rata sin lesionar y lesionada con ácido kaínico en el globo pálido en presencia del agonista de receptores D₄, PD 168,077. Imágenes modificadas de A. Surmeier *et al.*, 1996. B. Flores *et al.*, 1999. C. Acosta-García *et al.*, 2009.

1.7 Efecto de la activación de receptores D_{1-like} presinápticos sobre la liberación de GABA en la SNr.

La dopamina controla la liberación de GABA en la SNr mediante receptores dopaminérgicos localizados tanto en las terminales de las neuronas estriado-nigrales como en las pálido-nigrales. En las terminales estriado-nigrales se ha reportado la presencia de receptores D_{1-like} y D₃. La activación de los receptores D_{1-like} incrementa la liberación de GABA (Fig. 4A) (Rosales *et al.*, 1997; Avalos-Fuentes *et al.*, 2015); mientras que la activación del receptor D₃ no modifica por sí misma la liberación de este neurotransmisor, pero es capaz de incrementar la liberación producida por el receptor D₁, en un efecto modulado por la cinasa de calcio y calmodulina II (CaMKII) (Fig. 4A) (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013; Avalos-Fuentes *et al.*, 2015). Respecto a las terminales pálido-nigrales, el control dopaminérgico es mediado por receptores D₄, cuya activación disminuye la liberación de GABA en la SNr (Fig. 4B) (Acosta-García *et al.*, 2009).

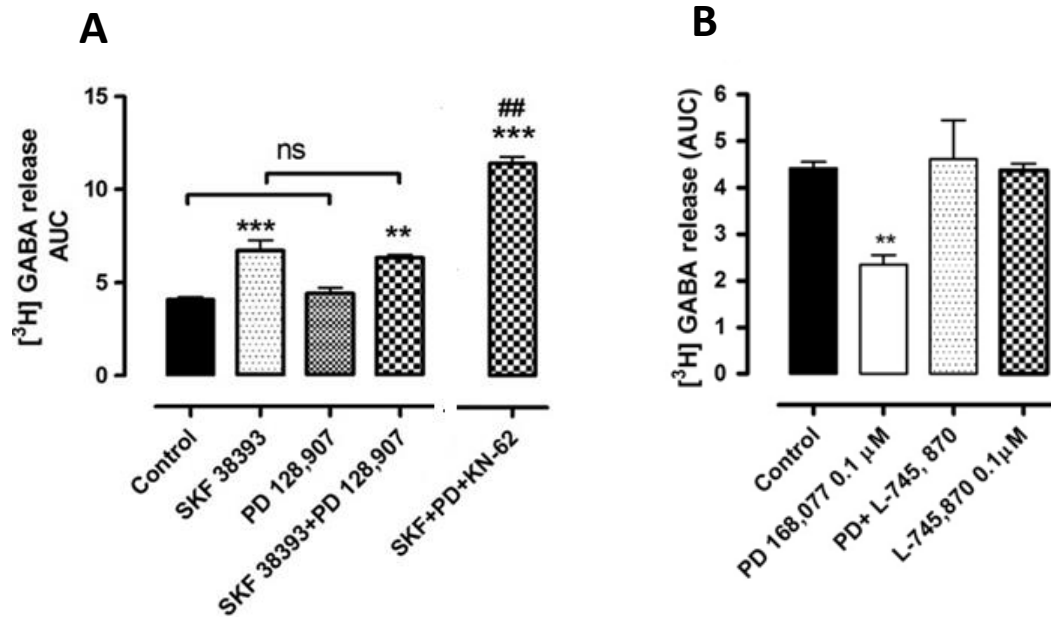


Fig. 4. Efecto de la activación de receptores D_{1-like}, D₃ y D₄ sobre la liberación de GABA en la SNr. **A.** La activación del receptor D_{1-like} estriado-nigral con el agonista SKF 38393 en rebanadas de SNr de rata reserpinizada incrementa la liberación de [³H]-GABA, la activación del receptor D₃ estriado-nigral con el agonista PD 128,907 incrementa la liberación de GABA producida por la activación del receptor D₁ únicamente en presencia del inhibidor de la CaMKII, KN62, y por sí solo no tiene efecto. Imagen modificada de (Avalos-Fuentes, Albarran-Bravo et al. 2015) **B.** La activación del receptor D₄ pálido-nigral con el agonista PD 168,077 disminuye la liberación de [³H]-GABA en la SNr proveniente de rata reserpinizada. Gráfico obtenido de Acosta-García *et al.*, 2009.

1.8 Efecto de la activación de receptores D_{1-like} subtálamo-nigrales sobre la liberación de glutamato en la SNr.

Los receptores a dopamina presinápticos no sólo modifican la liberación de GABA en la SNr, también controlan la entrada glutamatérgica. Estudios de microdiálisis muestran que la activación de receptores D_{1-like}, muy probablemente D₅, con SKF 38393 incrementa la liberación de glutamato en la SNr (Rosales *et al.*, 1997). Posteriormente, se demostró que receptores D_{1-like} localizados en las terminales subtálamo-nigrales incrementan la amplitud de corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) evocadas en el NST y registradas en la SNr (Figs. 5A y 5B) y además es un efecto

presináptico, ya que se modifica la razón de pulsos pareados (Fig. 5C) (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006). Experimentos de liberación de [³H]-glutamato realizados en rebanadas de rata reserpinizada reproducen los resultados encontrados previamente, al incrementar la liberación de este neurotransmisor (Fig. 5D) (Cortes *et al.*, 2010)

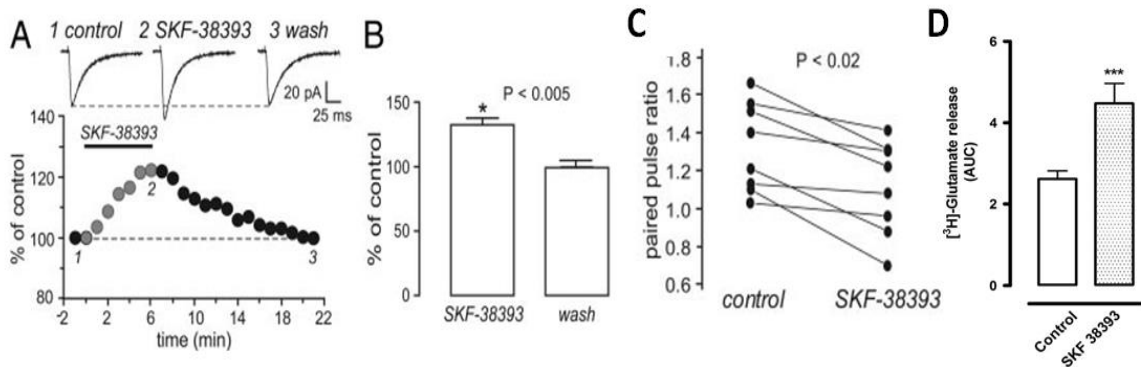


Fig. 5. Efecto de la activación de receptores D₁-like sobre la liberación de glutamato en la SNr. A. Curso temporal de la activación del receptor D₁-like con el agonista SKF 38393 sobre la amplitud de corrientes post-sinápticas excitatorias subtálamo-nigrales en rebanadas de cerebro de rata. **B.** Gráfico de 10 experimentos en A. El agonista incrementa la amplitud de las EPSCs. **C.** El efecto del agonista de receptores D₁-like es presináptico, ya que se modifica la razón (2do EPSC/1er EPSC) de pulsos pareados. **D.** La activación de receptores D₁-like incrementa la liberación de [³H]-glutamato en rebanadas de SNr de rata previamente reserpinizada. A, B y C tomadas de Ibañez-Sandoval *et al.*, 2006; D, modificada de Cortes *et al.*, 2010.

1.9 Efecto de la activación de receptores D₂-like subtálamo-nigrales sobre la liberación de glutamato en la SNr.

La familia de receptores D₂-like subtálamo-nigrales también modula la entrada glutamatérgica a la SNr. Sin embargo, disecar el efecto de la activación de los receptores D₂ y D₃ había sido complicado debido a la falta de agonistas y antagonistas selectivos. Ibañez-Sandoval *et al.*, en el 2006 demostraron que la activación de receptores D₂/D₃ con quinpirole en las terminales subtálamo-nigrales disminuye la amplitud de corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) en la SNr y que este efecto es

presináptico (Figs. 6A y 6B). Sugiriendo que los receptores D_2 y D_3 pueden modificar la neurotransmisión glutamatérgica en la SNr. La participación del receptor D_4 en el control de la entrada de glutamato no es clara: algunos estudios sugieren que la activación de este receptor disminuye la amplitud de corrientes polisinápticas excitatorias en la SNr (Shen y Johnson, 2012); sin embargo, el ARNm para el receptor D_4 no ha sido localizado en el NST, por lo que se sugiere que las proyecciones subtálamo-nigrales no lo poseen y el control de glutamato por el receptor D_4 resulta controversial.

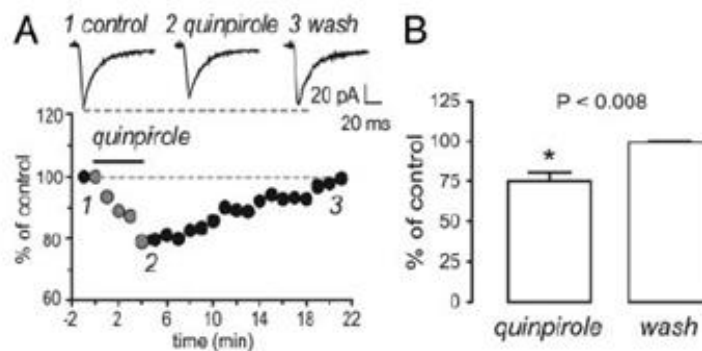


Fig 6. El agonista de receptores D_2/D_3 disminuye la amplitud de las EPSCs en la terminal subtálamo-nigral. **A.** Gráfica que muestra el curso temporal de la acción del agonista de receptores D_2 -like (quinpirole) sobre la amplitud de las corrientes evocadas EPSCs en el NST y registradas en la SNr de rata. Los trazos superiores son registros representativos obtenidos en los momentos 1, 2 y 3 indicados en el curso temporal. **B.** Histograma que resume el experimento: el agonista produce una disminución significativa en la EPSC. Tomado de Ibanez-Sandoval *et al.*, 2006.

1.10 Los agonistas del receptor D_3 recuperan la actividad motora en modelos con la EP.

Los agonistas dopaminérgicos como el pramipexole (agonista preferencial del receptor D_3) disminuyen con éxito los síntomas de la EP en modelos animales y pacientes (Fig. 3) y de manera similar a la L-Dopa, que es el fármaco más eficaz para tratar la enfermedad (Tayarani-Binazir *et al.*, 2010). Los receptores presentes en los GB, podrían ser el blanco de agonistas D_3

como el pramipexole y participar en los efectos motores observados. De manera significativa la proteína se ha localizado prácticamente en todos los núcleos de los GB (Fig. 2C): además del estriado, el receptor D₃ se localiza en la SNc (Hall *et al.*, 1996), SNr (Diaz *et al.*, 1995) y NST (Flores *et al.*, 1999; Sokoloff *et al.*, 2006). En la sección 1.6 se mencionó que en la SNr no se ha localizado el ARNm para ningún receptor dopaminérgico, incluido el receptor D₃, por lo que se cree que la proteína pertenece a las aferencias: principalmente desde el NST (Flores *et al.*, 1999; Sokoloff *et al.*, 2006) y estriado (Surmeier *et al.*, 1996).

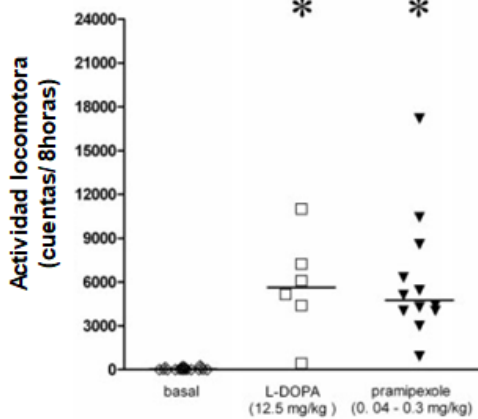


Fig. 7. El pramipexole mejora la actividad motora en monos parkinsonianos. Monos lesionados con MPTP (□ tratado con L-Dopa o ▼ tratado con pramipexole) disminuyen la dificultad motora después de la administración sistémica de pramipexole con respecto a la condición basal antes de la administración del fármaco. La mejora no es significativamente diferente a la obtenida con L-Dopa. *p < 0.05 con respecto a la condición basal Modificado de Tayarani-Binazir, *et al.*, 2010.

1.11 La inhibición del NST reduce los síntomas en modelos con la EP.

La depleción de dopamina también afecta el disparo tónico de varios núcleos de los GB, entre ellos el del NST, que se incrementa de 20 a 42 Hz en pacientes con la EP (Benazzouz *et al.*, 2002) y de 18.8 a 25.8 en monos lesionados con MPTP (Bernardinelli y Chatton, 2008). Además, el patrón de disparo de neuronas subtálamicas también cambia, incrementando de manera significativa el disparo en ráfagas, lo que se ha relacionado con rigidez y acinesia. Como se mencionó anteriormente, el incremento en la actividad del NST influye directamente en los núcleos de salida, aumentando el disparo de los mismos, de manera opuesta, la reducción en la actividad del NST trae consigo disminución en la inhibición de los núcleos de salida sobre

el tálamo, facilitando el movimiento. La importancia del NST se ha demostrado mediante su lesión farmacológica o por estimulación a alta frecuencia lo que produce incremento en la actividad de monos sanos, conocido como síndrome hiperkinético (Beurrier *et al.*, 1999). Así como en modelos de primates con la EP, la reducción en la actividad del NST disminuye los síntomas de la enfermedad (Fig. 8) (Guridi *et al.*, 1996).

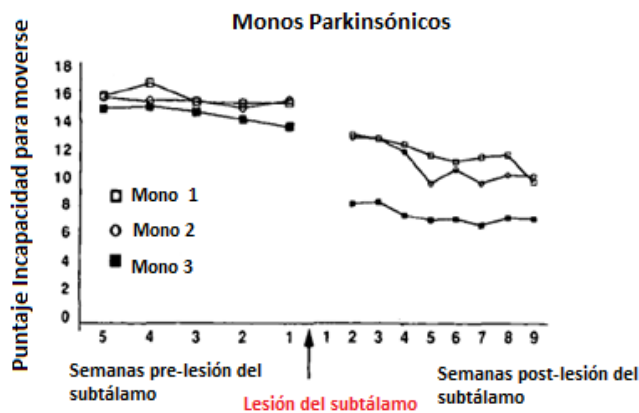


Fig. 8. La lesión del subtálamo disminuye la incapacidad de movimiento en monos parkinsónicos. Tres monos lesionados con MPTP disminuyen la dificultad para realizar movimientos después de la lesión unilateral del subtálamo con ácido kaínico. Gráfico modificado de Guridi *et al.*, 1996.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La SNr es el núcleo de salida de los GB, sus neuronas GABAérgicas controlan la actividad de núcleos premotores tálamo-corticales y por lo tanto el movimiento. Los receptores *D₁-like* y *D₂-like* de las aferentes subtálamo-nigrales modulan la liberación de glutamato en neuronas de la SNr; sin embargo, su contribución relativa en el control de la liberación de glutamato, así como sus interacciones y propiedades farmacológicas no han sido estudiadas. Esto es importante ya que la prevalencia de un efecto inhibitorio o estimulador de la liberación de glutamato modifica la actividad tanto de la SNr como la motora. Así también, es de particular interés el estudio del efecto que tiene la activación del receptor *D₃* sobre la liberación de glutamato en condiciones normales y en condiciones de denervación dopaminérgica, ya que se ha observado que agonistas preferenciales de este receptor disminuyen la sintomatología tanto en pacientes como en modelos de la enfermedad de Parkinson. Dado que la activación de receptores *D₂-like* subtálamo-nigrales reduce la entrada glutamatérgica a la SNr, es posible que los receptores *D₃* presentes en las terminales subtálamicas sean el blanco terapéutico de los fármacos y contribuyan a la mejoría observada en pacientes con esta enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Los receptores dopaminérgicos *D_{1-like}*, *D₂* y *D₃* modulan de manera significativa y en diferente magnitud la liberación de glutamato en las terminales subtálamo-nigrales, en tanto que los receptores *D₄* no tienen una participación significativa.

El receptor *D₃* de las terminales subtálamo-nigrales disminuye la liberación de glutamato en condiciones normales y este efecto se potencia después de la denervación.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la contribución relativa, las propiedades farmacológicas y las interacciones de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos subtálamo-nigrales en el control de la liberación de [³H]-glutamato en la sustancia nigra reticulada de la rata.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la contribución relativa y constantes farmacológicas (E_{max} y EC_{50}) de los receptores dopaminérgicos en el control de la liberación de [3H]-glutamato en la SNr de la rata reserpinizada activados con dopamina exógena.
- Estudiar la contribución relativa y constantes farmacológicas (E_{max} y EC_{50}) de los receptores dopaminérgicos en el control de la liberación de [3H]-glutamato en la SNr de la rata reserpinizada activados con agonistas selectivos.
- Evaluar el efecto de las interacciones entre los diferentes receptores dopaminérgicos sobre la liberación de [3H]-glutamato en la SNr de la rata reserpinizada.
- Evaluar el efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos sobre la liberación de [3H]-glutamato en la SNr de la rata no reserpinizada.
- Determinar la vía de señalización por la que el receptor D_3 modula la liberación de [3H]-glutamato en la SNr de la rata reserpinizada.
- Determinar si la CaMKII α modula el efecto del receptor D_3 en la liberación de [3H]-glutamato en la SNr y si interactúan físicamente en el NST.
- Determinar el efecto que tiene la denervación en la actividad del receptor D_3 sobre la liberación de [3H]-glutamato en la SNr.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Para realizar los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-220 g de peso, los animales estuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12h/12h a temperatura de 22 ± 2 °C, se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

6.2 Administración de reserpina

Para eliminar la dopamina endógena del sistema, los animales fueron pre-tratados con reserpina (10 mg/kg, vía intraperitoneal) 18 horas antes de la preparación de las rebanadas. El tratamiento produce una disminución en los niveles de dopamina en más del 92% en la SN (Nava-Asbell *et al.*, 2007).

6.3 Preparación de rebanadas

Los animales se decapitaron y rápidamente se extrajo el cerebro. Se sumergió en solución Krebs-Henseleit (Sol. KH) a 4 °C, a la que se le perfundió constantemente una mezcla O₂/CO₂ (95:5 vol/vol). La composición de la Sol. KH fue la siguiente (mM): NaCl 118.25; KCl 1.75; KH₂PO₄: 1.25 y MgSO₄: 1; D-glucosa: 10; NaHCO₃: 25; CaCl₂: 2. Se adicionó ácido aminoxiacético a una concentración final de 200 µM con la finalidad de inhibir a la descarboxilasa de ácido glutámico (Kofalvi *et al.*, 2005). Posteriormente, se obtuvieron rebanadas coronales de 300 µm que contenían la SNr utilizando un vibratomo (Campden Inc., Cambridge, UK). Se disecó la SNr con ayuda de un equipo estereotáxico.

6.4 Liberación de [³H]-glutamato

Para los experimentos de liberación [³H]-glutamato se empleó el protocolo modificado de Mitchell y Doggett (1980). Las rebanadas de SNr se colocaron en Sol. KH a 37°C y con burbujeo constante durante 15 min, posteriormente fueron incubadas durante 30 min con 2 mL de Sol. KH que contenía 100 nM de [³H]-glutamato y 200 µM de ácido dihidroxikaínico (DHK) para disminuir la captura de [³H]-glutamato por parte de los astrocitos (Bernardinelli y Chatton, 2008). Posteriormente, se retiró la Sol. KH que contenía el neurotransmisor radioactivo y DHK, y se realizaron tres lavados con Sol. KH fresca a 37 °C. Las rebanadas fueron colocadas en las 20 cámaras de un sistema de perfusión en paralelo. Cada cámara contenía de dos a tres rebanadas y fueron perfundidas a una velocidad de 0.5 mL/min con ayuda de una bomba peristáltica multicanal (Brandel PP120). Las rebanadas se perfundieron durante 25 min con la Sol. KH antes de iniciar la recolección de fracciones. Se colectaron diez fracciones de 4 min cada una, en las primeras cuatro las rebanadas fueron perfundidas con Sol. KH de [K⁺]: 3 mM, mientras que en las seis restantes se utilizó una Sol. KH de [K⁺] 30 mM con la siguiente composición mM: NaCl 91.25; KCl 28.75; KH₂PO₄: 1.25 y MgSO₄: 1; D-glucosa: 10; NaHCO₃: 25; CaCl₂: 2, esto con la finalidad de despolarizar a las células.

6.5 Determinación de la radioactividad

A cada muestra se le agregó líquido de centelleo y al finalizar el experimento se recuperó el tejido de las cámaras para determinar la cantidad remanente de tritio, se adicionó 1 mL de HCl 1M, una hora después se adicionó líquido de centelleo. Posteriormente las muestras fueron colocadas en un contador de centelleo (Beckman Coulter) y se determinó el número de desintegraciones por minuto. Los resultados se normalizaron como un

cociente de la reactividad presente en cada fracción entre la radioactividad del tejido.

6.6 Lesión con 6-OHDA

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (300 mg/kg i.p) y se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se inyectó 1 μ L de la neurotoxina 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) a una concentración de 16 μ g/ μ L en el haz medial del cerebro anterior (MFB) de manera unilateral y de acuerdo a las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (1998) AP: -0.9, L: 2.1 con respecto a Bregma y P: -7.5 con respecto a la dura. La inyección se hizo a una velocidad de flujo de 0.2 μ L/min. Una semana después de la cirugía, se hizo la prueba de giro utilizando anfetamina (8 mg/kg). Se seleccionaron aquellos animales que presentaron al menos 8 giros/min ipsilaterales a la lesión durante una hora de observación. Los cerebros fueron removidos para la preparación de rebanadas 14-21 días después de la lesión con 6-OHDA.

6.7 Preparación de homogenados para coimmunoprecipitación

Se obtuvieron rebanadas de NST y de estriado (aproximadamente 300 μ m de grosor) y se colocaron en solución Krebs Hepes fría de la siguiente composición (mM): NaCl 127, KCl 3.73, MgSO₄ 1.18, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 1.8, HEPES 20, Glucosa 11. Las rebanadas se estabilizaron durante 10 minutos a 37 °C con solución Krebs Hepes fresca y posteriormente se despolarizaron con solución Krebs Hepes que contiene una concentración de 30 mM de K⁺ (10 minutos, 37 °C). Transcurrido este tiempo se cambió la solución por Krebs Hepes fría para detener el proceso de despolarización. Se retiró la solución Krebs Hepes, se adicionó solución RIPA (ortovanadato de sodio 1 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 100 mM, glicerol

10%, Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EGTA 1mM, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 1%) y se homogenizó con ayuda de un pistilo de teflón. El homogenado se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, se adicionaron inhibidores de proteasas y se homogenizó durante 10 seg, 30% de amplitud con un homogenizador ultrasónico. Se cuantificó la concentración de proteína total por el método de Bradford.

6.8 Coinmunoprecipitación

Las muestras se pre-aclararon durante 3 horas con 20 µL de perlas recubiertas con proteína A/G a 4 °C y utilizando un agitador circular. Se precipitaron las perlas mediante centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína nuevamente. A las muestras pre-aclaradas (500 µg de proteína total) se adicionaron anticuerpos contra D₃ (1/200) y se completó un volumen de 400 µL con solución RIPA. Las muestras se colocaron en un agitador circular durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 20 µL de perlas (A/G) y se incubaron durante 3 horas a 4 °C en agitador circular. Se hicieron 7 lavados de 5 minutos en el agitador circular con 400 µL de solución de equilibrio (PMSF 1 mM, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 0.1%, complete 0.5X) y con centrifugación (30 seg, 4000 rpm) entre cada lavado. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y las perlas fueron resuspendidas en 30 µL de solución de muestra 5X (Glicerol 50%, Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Azul de bromofenol 0.08%, β-mercaptoetanol 5%). Las muestras se calentaron hasta ebullición durante 10 minutos y se realizó electroforesis. Los controles negativos se prepararon de manera similar a las muestras pero en ausencia del anticuerpo inmunoprecipitante.

6.9 Western-Blot

Las proteínas inmunoprecitadas, controles negativos e *inputs* (al menos el 10% del total de la proteína a inmunoprecipitar) se migraron en un gel de poliacrilamida al 10%. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 3 horas a 250 mA. La membrana se bloqueó con PBS-T (Solución amortiguadora de fosfatos en presencia de Tween 20 al 0.1%) y leche descremada en polvo al 10% durante dos horas a temperatura ambiente (T.A). Las membranas se incubaron con anticuerpo primario contra CaMKII α total (1/2000, 2 horas, T.A). Se realizaron 3 lavados PBS-T y se incubaron durante 2 horas (T.A) con anticuerpo secundario anti-mouse (1/5000) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). Se realizaron 3 lavados con PBS-T y se revelaron con el reactivo quimiolumiscente Luminol. Se visualizó con ayuda de un escáner.

6.10 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias estadísticas entre tratamientos en los experimentos de liberación de [3 H]-glutamato, se calculó el área bajo la curva (AUC) en presencia de alto K $^+$ para cada grupo experimental y se expresó como porcentaje del control (cambio en la liberación de glutamato como porcentaje del control) en gráficas de barras que indican la media \pm el error estándar. Posteriormente, se realizó un Análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un post test de Tukey para comparaciones entre grupos y un análisis por la prueba T de Student para comparaciones entre dos grupos. Para obtener los valores estimado de EC $_{50}$, y Emax se construyeron curvas concentración-respuesta y se hizo un ajuste por regresión no lineal para una curva dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable. Los valores obtenidos para cada uno de los cuatro experimentos se promediaron para obtener la media y el error estándar. Los análisis se realizaron usando el software GraphPad prisma versión 7.03 (GraphPad Software, Inc.).

7. RESULTADOS

7.1 La dopamina controla liberación de [³H]-glutamato en la SNr a través de receptores D_{1-like} y D_{2-like}.

Evidencia previa indica que los receptores D_{1-like} y D_{2-like} participan en el control presináptico de la liberación de glutamato en la SNr. Para diseccionar la contribución relativa de los receptores D_{1-like} y D_{2-like}, primero probamos el efecto de 10 μM de dopamina sobre la liberación de [³H]-glutamato en rebanadas de SNr de rata previamente reserpinizada (para excluir los efectos de la dopamina endógena). Como podemos observar en el experimento representativo de la Fig. 9A y en el promedio de 10 experimentos de la Fig. 9B (resultados expresados como porcentaje del control), la dopamina estimula la liberación de [³H]-glutamato en un 53 % (152.9 ± 1.7 %) respecto al control. Al adicionar 100 nM del antagonista de receptores D_{1-like} SCH 23390, se desenmascara un efecto inhibitorio de la dopamina, disminuyendo la liberación de glutamato en un 51 % (50.6 ± 2.8 %) respecto al control. Por el contrario, el bloqueo de los receptores D_{2-like} con 100 nM del antagonista sulpiride potencia el efecto estimulador de la dopamina sobre la liberación en un 104 % (203.9 ± 4.8 %) respecto al control. La adición de ambos antagonistas restablece la liberación a niveles del control (DA + SCH + Sulpiride 101.5 ± 1.9 %, control 100%).

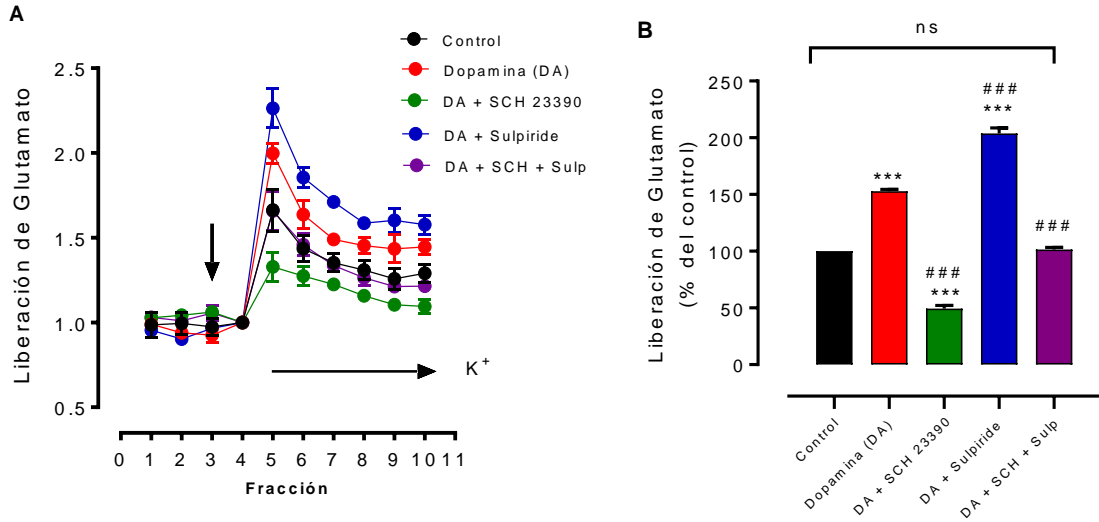


Fig. 9. La activación de los receptores D_1 -like y D_2 -like incrementa y disminuye respectivamente la liberación de glutamato en rebanadas de SNr de rata reserpinizada. A. Experimento representativo del curso temporal de la liberación de $[^3H]$ -glutamato producida por K^+ en rebanadas de SNr. Los fármacos fueron añadidos a partir de la fracción 3 para medir sus efectos en condiciones basales. La solución de 30 mM de K^+ se perfundió a partir de la fracción 5. Los círculos de color negro indican la liberación control, los de color rojo la presencia de dopamina (10 μ M), los de color verde la coperfusión de dopamina y SCH 23390 (100 nM), los de color azul representan la coperfusión de dopamina y sulpiride (100 nM), la coperfusión de los tres fármacos está representado por los círculos de color morado. **B.** Gráfico del área bajo la curva de los experimentos en A expresada como porcentaje del control, bajo las cuatro condiciones. Cada barra representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar, $n = 10$ experimentos, con 5 réplicas cada uno. ANOVA de una vía con un post-test de Tukey, *** $p < 0.001$ respecto al control. ### $p < 0.001$ respecto a dopamina.

7.2 La dopamina incrementa la liberación de $[^3H]$ -glutamato mediante la activación de receptores D_1 -like.

Dado que la dopamina activa ambos tipos receptores D_1 -like y D_2 -like, para determinar la contribución de los receptores D_1 -like y estimar la potencia y eficacia de la dopamina por ellos, se realizaron los experimentos estimulando los receptores D_1 -like con dopamina en presencia de sulpiride (100 nM), antagonista de receptores D_2 -like y que estuvo presente en el grupo de rebanadas del control. La Fig. 10A muestra el efecto estimulador de la dopamina (10 μ M) activando a receptores D_1 -like; un incremento del 98 %

con respecto al control fue observado ($198.4 \pm 5.8 \%$). La magnitud del incremento en la liberación bajo estas condiciones es cercana a la suma de la estimulación inducida por la dopamina sola (52.9% , Fig. 9B) y la inhibición inducida por dopamina en presencia de SCH 23390 (49.4% , Fig. 9B). El antagonista D_1 (SCH 23390, 100 nM) bloquea la respuesta de dopamina (DA + SCH $107.7 \pm 5.4 \%$, control 100%), pero no modifica la liberación por sí mismo. A continuación, se evaluaron parámetros farmacológicos de la dopamina activando a los receptores D_1 -like, para ello construimos una curva concentración-respuesta en presencia de dopamina (con sulpiride, 100 nM) (Fig. 10B), la estimulación dependiente de la concentración de dopamina tiene una media del $\log EC_{50} = -5.9 \pm 0.2$, equivalente a 1131 nM y un efecto máximo (E_{max}) de $203.3 \pm 12.9\%$. Indicando una potencia de la dopamina en el rango micromolar para estos receptores (ver tabla 2).

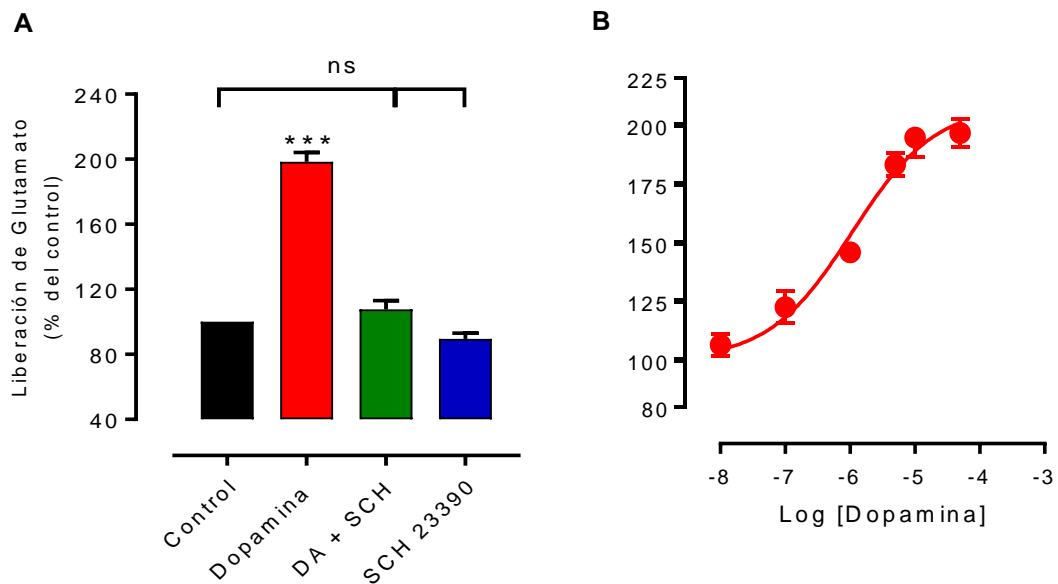


Fig. 10. La dopamina incrementa la liberación $[^3\text{H}]$ -glutamato de manera dependiente de la concentración a través de la activación de receptores D_1 -like. A. Efecto de la activación de receptores D_1 -like con $10 \mu\text{M}$ de dopamina sola, en presencia de 100 nM del antagonista de receptores D_1 -like SCH 23390 y efecto del antagonista por sí solo. En todas las condiciones se coperfundió 100 nM de sulpiride (antagonista de los receptores D_2 -like). Cada barra representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar, $n = 4$ experimentos, con 5 réplicas cada uno. Se realizó ANOVA de una vía, con un post-test de Tukey $***p < 0.001$ respecto al control, ns no hay diferencia significativa. **B.** Curva concentración respuesta en presencia de dopamina. Cada punto representa el promedio de 4 repeticiones \pm el error estándar.

Tabla 2. Parámetros estimados de las curvas concentración-respuesta sobre el efecto de los diferentes compuestos dopaminérgicos sobre la liberación de glutamato.

Compuesto	Log EC ₅₀	EC ₅₀ (nM)	EMax %	Coefficiente Hill
Receptor D₁-like				
Dopamina	-5.9 (-6.1 a -5.7)	1131	203 (190 a 216)	0.76
SKF 38393	-8.5 (-8.8 a -8.2)	3.1	171 (159 to 183)	0.71
Receptor D₂-like				
Dopamina	-6.6 (-6.8 a -6.4)	250.6	50 (46 a 54)	0.83
Receptor D₂				
Dopamina	-6.1 (-6.3 a -5.9)	797	11 (8 a 14)	2.01
Sumanirole	-8.4 (-8.8 a -8.0)	4.0	14 (11 a 17)	1.02
Receptor D₃				
Dopamina Estimado de D ₃ +D ₂ menos D ₂	-7.2 (-7.4 a -7.0)	65.1	39 (35 a 42)	0.84
PD 128,907	-8.2 (-8.4 a -8.0)	5.9	45 (39 a 51)	1.15
PD 128,907 Estimado en rata denervada	-9.0 -9.4 a -8.6	1.1	70 (61 a 79)	0.57

7.3 Contribución relativa de los receptores D₂, D₃ y D₄ al efecto inhibitorio de la dopamina.

El efecto de la dopamina sobre la liberación de glutamato (Fig. 9B, en el grupo experimental DA + SCH 23390) mediado por los receptores D_{2-like} fue disecado para determinar la contribución de cada subtipo de receptor integrante de esta familia: D₂, D₃ y D₄. Como se muestra en la Fig. 11A, dopamina (10 µM) en presencia de SCH 23390 (100 nM) inhibe la liberación de glutamato en un 40 % respecto al control (59.1 ± 5.9 %). Este efecto fue totalmente bloqueado por el antagonista de los receptores D_{2-like}, sulpiride (100 nM) (DA + Sulpiride 105.1 ± 5.0 %, control 100%), mientras que por sí solo no modifica la liberación de glutamato. La participación del receptor D₄ fue determinado por el uso del antagonista selectivo, L 745,870 (100 nM). Como podemos observar en la Fig. 11B, L 745,870 no modifica el efecto inhibitorio de la dopamina sobre la liberación (DA 61.5 ± 1.0 %, DA + L 745,870 61.0 ± 4.8 %), por sí solo no modifica la liberación.

Posteriormente determinamos la contribución relativa de los receptores D₂ y D₃. Para ello utilizamos GR 103,691 (10 nM), antagonista selectivo para el receptor D₃ (Murray *et al.*, 1995b; Audinot *et al.*, 1998) y L 741,626 (50 nM), antagonista selectivo para el receptor D₂ (Kulagowski *et al.*, 1996). Como se muestra en la Fig. 11C, el GR 103,691 reduce el efecto inhibitorio de la dopamina de 50 % a cerca de 10 % con respecto al control, pero aún es significativo (DA 51.6 ± 2.4 %, DA + GR 90.6 ± 1.0 %). La inhibición remanente de la liberación mediada por dopamina es bloqueada por la coadición de L 741,626 a la preparación (DA + GR + L 741,626 100.8 ± 0.9%, control 100%). Ninguno de los antagonistas modifica por sí mismo la liberación en ratas tratadas previamente con reserpina. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de la dopamina es mediado principalmente por los receptores D₃ y en menor grado por los receptores D₂.

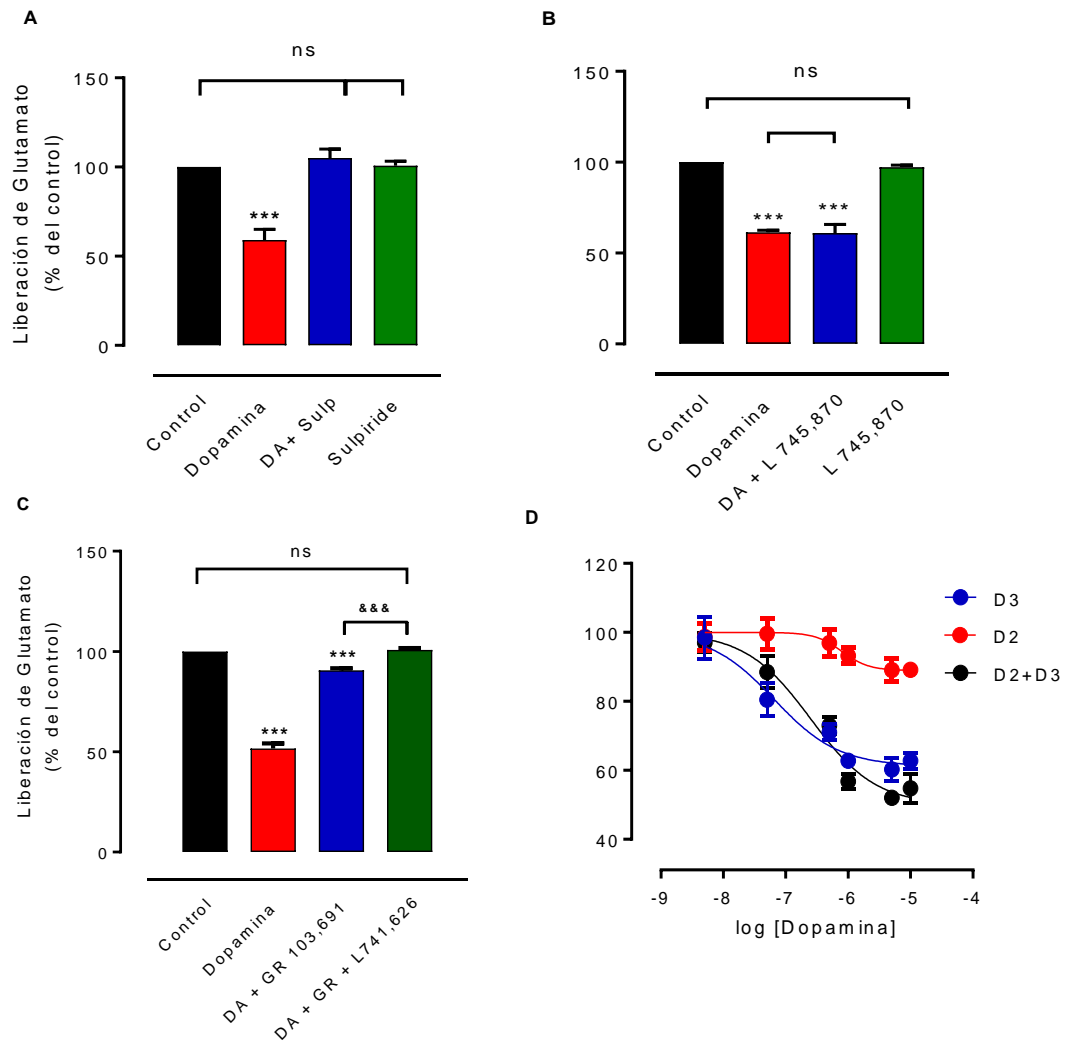


Fig. 11. Contribución relativa de los receptores D₂, D₃ y D₄ al efecto inhibitorio de la dopamina sobre la liberación [³H]-glutamato. En todos los experimentos se coperfundió 100 nM de SCH 23390 (antagonista de receptores D₁-like). **A.** Efecto de la activación de receptores D₂-like con 10 μM de dopamina sola y en presencia de 100 nM del antagonista de receptores D₂-like, sulpiride, así como el efecto del antagonista por sí sólo. **B.** El bloqueo del receptor D₄ con el antagonista L 745,870 (100 nM) en presencia de dopamina no modifica el efecto inhibitorio de 10 μM dopamina por sí sola, el antagonista (100 nM) no tiene efecto por sí mismo. **C.** Efecto de la activación de receptores D₂-like con 10 μM de dopamina, en presencia de 10 nM del antagonista de receptores D₃ GR 103,691 y del antagonista de receptores D₂ L 741,626 (50 nM). Cada barra representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar, n = 4 experimentos en A y B, n = 8 en C, con 5 réplicas cada uno. Se realizó ANOVA de una vía, con un post-test de Tukey ***p < 0.001 respecto al control, &&&p < 0.001 respecto a dopamina + GR 103,691, ns no hay diferencia significativa. **D.** Curvas concentración-respuesta: en presencia de dopamina (círculos negros, activación receptores D₂ + D₃), adicionando el antagonista de receptor D₃, GR 103,691 (10 nM), en presencia de dopamina (círculos rojos, activación receptores D₂) y restando punto por punto la curva color rojo a la curva color negro (círculos azules, activación receptores D₃). Cada punto representa el promedio de 4 repeticiones ± el error estándar.

También se obtuvieron constantes farmacológicas de la activación de receptores D₂ y D₃ con dopamina sobre la liberación de glutamato. Para ello se construyeron diferentes curvas concentración-respuesta (Fig. 11D): para obtener la estimulación de receptores D₂-like (D₂ + D₃, curva color negro) se adicionó dopamina a diferentes concentraciones (en presencia de SCH 23390, 100 nM), para obtener la curva de la activación del receptor D₂ (curva color rojo), se adicionó dopamina y GR 103,691 (10nM) (en presencia de SCH 23390, 100 nM) y finalmente, para obtener la curva correspondiente a la activación del receptor D₃ (curva color azul) se hizo una sustracción punto por punto de la curva de dopamina menos la curva en presencia de GR 103,691. Los resultados se muestran en la tabla 2. La EC₅₀ de la dopamina por los receptores D₂ (EC₅₀ 797 nM, log EC₅₀ -6.1 ± 0.2; Emax = 11.1 ± 3.0 %) es más alta que la estimada para los receptores D₃ (EC₅₀ 65.1 nM, log EC₅₀ -7.2 ± 0.2; Emax = 38.9 ± 3.3 %). Por otro lado, la EC₅₀ de la dopamina para los receptores D₂ es similar a la que se obtuvo para los receptores D₁-like (EC₅₀ 1131 nM, log EC₅₀ = -5.9 ± 0.2), y a su vez la EC₅₀ para los receptores D₃ es mucho menor a la obtenida para los receptores D₁-like.

7.4 Efecto de la activación de receptores D₁-like, D₂ y D₃ con agonistas selectivos.

A continuación evaluamos si la activación de los receptores D₁-like, D₂ y D₃ con agonistas selectivos reproducía los resultados obtenidos con dopamina sobre la liberación de glutamato. Activamos los receptores D₁-like con el agonista SKF 38393 (Neumeyer *et al.*, 2003), los receptores D₃ con el agonista PD 128,907 (Pugsley *et al.*, 1995), y los receptores D₂ con el agonista sumanirole (McCall *et al.*, 2005).

El efecto de SKF 38393 (1µM) solo y en presencia de SCH 23390 (100 nM) se muestra en la Fig. 12A. El agonista del receptor D₁ incrementa la liberación en 65 % (165.0 ± 9.1 %) con respecto al control y al adicionar

SCH 23390 a la preparación, se previene todo el efecto estimuladorio ($99.0 \pm 4.0 \%$), llevando la liberación a niveles del control. SCH 23390 no modifica la liberación por sí solo. También se construyó una curva concentración-respuesta que permitiera obtener la EC_{50} y E_{max} de SKF 38393 (Fig. 12D, curva en color rojo y tabla 2). En comparación con la curva concentración-respuesta de dopamina activando receptores D_1 -like de la Fig. 10B (Dopamina E_{max} $203.3 \pm 12.9\%$), aparentemente el SKF 38393 es menos efectivo en promover la liberación de glutamato (SKF 38393 E_{max} $170.7 \pm 11.64 \%$). Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa respecto a la dopamina activando receptores D_1 -like ($p = 0.11$, $n = 4$). Mientras que la EC_{50} es prácticamente dos órdenes de magnitud más baja para el SKF 38393 (EC_{50} 3.1 nM $\log EC_{50} = -8.5 \pm 0.3$) que para la dopamina (EC_{50} 1131 nM $\log EC_{50} = -5.9 \pm 0.2$).

Para activar a los receptores D_2 usamos el agonista sumanirole (100 nM) (Fig. 12B.). Podemos observar que el agonista produce una modesta, pero significativa inhibición de la liberación ($87.2 \pm 2.8 \%$). El efecto fue totalmente bloqueado por la adición del antagonista selectivo del receptor D_2 , L 741,626 (50 nM) ($100.5 \pm 1.9 \%$), y por sí solo no tiene efecto. Al construir una curva concentración-respuesta comprobamos que sumanirole fue igualmente efectivo para inhibir la liberación de glutamato como se observa en la Fig. 12D, curva color morado (E_{max} $13.7 \pm 2.8 \%$), que la dopamina estimulando a los receptores D_2 como se ilustra en la Fig. 11D, curva color rojo ($E_{max} = 11.1 \pm 3.0 \%$). En contraste, la EC_{50} es dos órdenes de magnitud menor para sumanirole (EC_{50} 4.0 nM, $\log EC_{50} -8.4 \pm 0.4$) que para dopamina (EC_{50} 797 nM, $\log EC_{50} -6.1 \pm 0.2$).

El efecto del agonista selectivo del receptor D_3 , PD 128,907 (100 nM), sobre la liberación de glutamato y su antagonismo por GR 103,691 (10 nM) se muestra en la Fig. 12C. El agonista del receptor D_3 disminuye la liberación de glutamato en un 39 % ($61.43 \pm 2.7 \%$), mientras que al adicionar el GR 103,691 se previene todo el efecto inhibitorio ($96.0 \pm 4.2 \%$) y por sí mismo

no tiene efecto. PD 128,907 es igual de potente inhibiendo la liberación que la dopamina como observamos en la Fig. 12D, curva en color negro (Emax 45.4 ± 5.9 %), comparada con la curva en color azul de la Fig. 11D (Emax = 38.9 ± 3.3 %). La EC₅₀ fue un orden de magnitud mayor para PD 128,907 (EC₅₀ 5.9 nM log EC₅₀ = -8.2 ± 0.2), que para dopamina (EC₅₀ 65.1 nM log EC₅₀ -7.2 ± 0.2), los parámetros se pueden observar en la tabla 2.

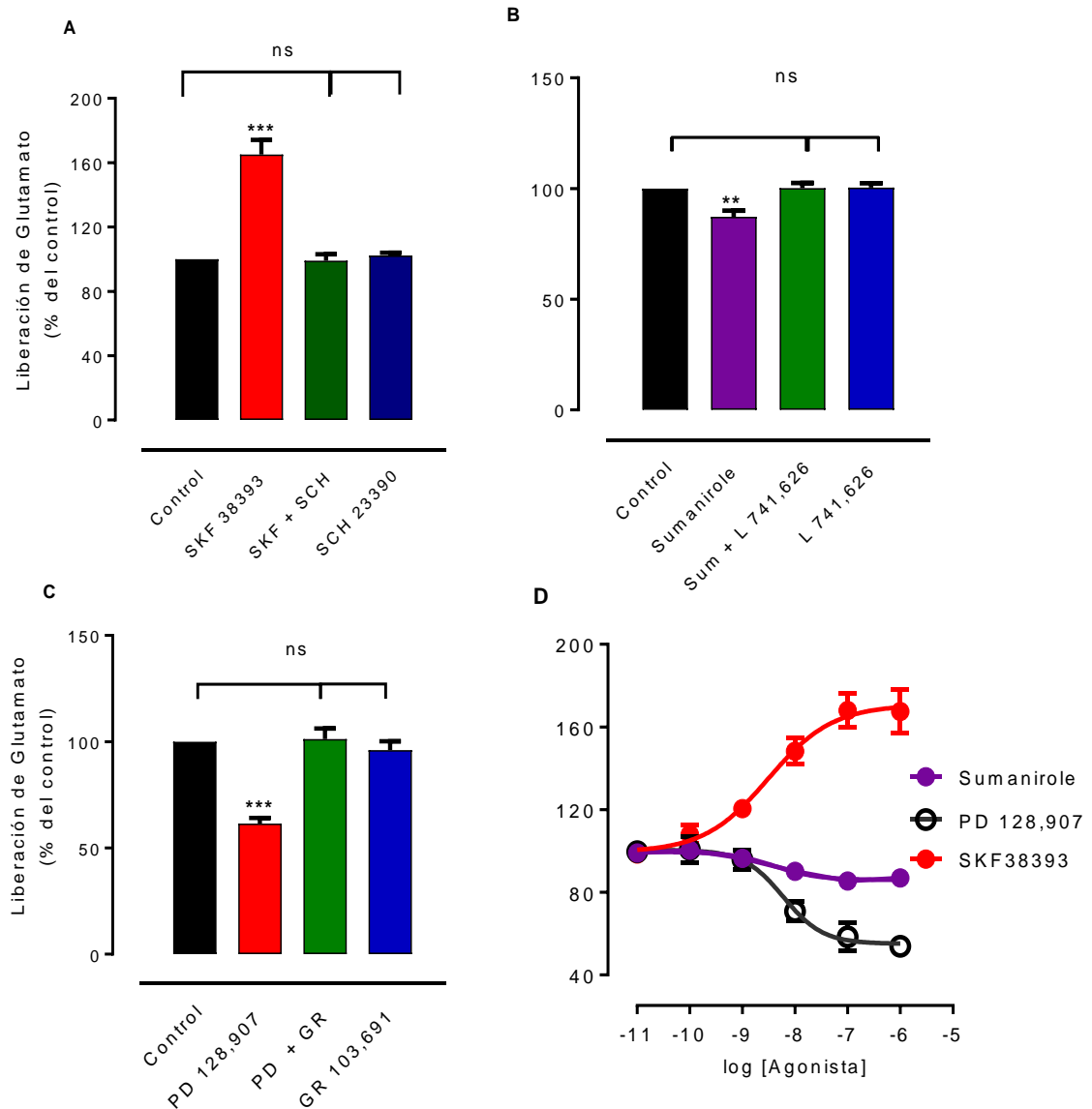


Fig. 12. Efecto de la activación de receptores D_{1-like}, D₂, D₃ y D₄ con agonistas selectivos sobre la liberación de [³H]-glutamato. **A.** Efecto de la activación de receptores D_{1-like} con 1 μM del agonista SKF 38393, en presencia de 100 nM del antagonista SCH 23390 y el efecto de 100 nM del antagonista por sí sólo. **B.** Efecto de la activación de receptores D₂ con 100 nM del agonista sumanirole, en presencia de 50 nM del antagonista L 741,626 y el efecto de 50 nM del antagonista por sí solo. **C.** Efecto de la activación de receptores D₃ con 100 nM del agonista PD 128,907, en presencia de 10 nM del antagonista GR 103,691 y el efecto de 10 nM del antagonista por sí solo. Se representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar, n = 4 experimentos, con 5 réplicas cada uno. ANOVA de una vía, post-test Tukey ***p < 0.001, **p < 0.01 respecto al control, ns no hay diferencia significativa. **D.** Curvas concentración respuesta en presencia de agonistas selectivos: SKF 38390 (círculos rojos), sumanirole (círculos morados), PD 128,907 (círculos negros). Cada punto representa el promedio de 4 repeticiones ± el error estándar.

7.5 Interacción de receptores dopaminérgicos.

Dado que los receptores dopaminérgicos pueden existir en la misma neurona e interactuar entre ellos en el control de la liberación de glutamato, estudiamos la relación entre los receptores D_{1-like} con D₂, D_{1-like} con D₃ y D₂ con D₃ en el control de la liberación de glutamato. La relación entre los receptores D_{1-like} y D₂ se muestra en la Fig. 13A. Como previamente demostramos, se observa un incremento en la liberación producido por SKF 38393 (174.6 ± 2.9 %) y una disminución producida por sumanirole (84.4 ± 1.1 %) cuando activan a sus respectivos receptores. La coactivación de ambos receptores también incrementa la liberación de glutamato (150.0 ± 2.9 %) pero la magnitud es menor que para el SKF 38393 solo.

La relación entre los receptores D₁ y D₃ se exploró en los experimentos mostrados en la Fig. 13B. Como previamente demostramos, se observa un incremento en la liberación por la activación de receptores D₁ con SKF 38393 (158.1 ± 5.9 %) y una disminución producida por la activación de receptores D₃ con PD 128,907 (51.5 ± 2.2 %). Durante la coactivación de ambos receptores, PD 128,907 contrarresta el efecto de SKF 38393 (105.6 ± 3.6 %). Como ocurre con la coactivación con el receptor D₂, el receptor D₃ disminuye la estimulación del receptor D₁ activado con SKF 38393; dado que la

diferencia entre las medias de SKF 38393 solo, menos SKF 38393 + PD 128,907 (52.4 puntos porcentuales) es similar a la del control menos PD 128,907 solo (48.5 puntos porcentuales), se sugiere que el efecto del receptor D₃ está preservado durante la activación de receptores D₁.

Finalmente, la interacción entre los receptores D₂ y los receptores D₃ se muestra en la Fig. 13C. Nuevamente, observamos el efecto inhibitorio de cada agonista activando a sus respectivos receptores sobre la liberación de glutamato (Sumanirole 84.7 ± 1.3 %, PD 65.4 ± 1.2 %). Al coactivar los receptores D₂ y D₃ con los agonistas se encuentra un efecto aditivo (50.8 ± 1.3 %) que es diferente comparado con el efecto de cada agonista por si solo con respecto al control.

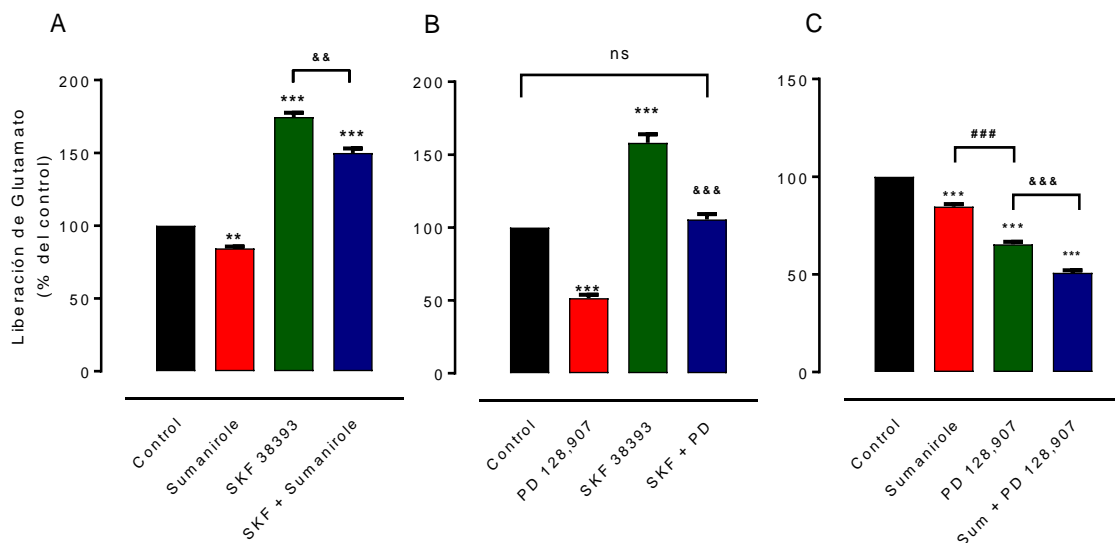


Fig. 13 Interacción entre receptores D_{1-like}/D₂, D_{1-like}/D₃ y D₂/D₃. **A.** Gráfico que muestra el efecto de la activación de los receptores D₂ con el agonista selectivo sumanirole (100 nM), activación de los receptores D_{1-like} con el agonista SKF 38390 μM o ambos. **B.** Efecto de la activación de los receptores D₃ con el agonista selectivo PD 128,907 (100 nM), activación de los receptores D_{1-like} con el agonista SKF 38390 μM o ambos. **C.** Efecto de la activación de los receptores D₂ con el agonista selectivo sumanirole (100 nM), activación de los receptores D₃ con el agonista selectivo PD 128,907 (100 nM) o ambos. Se representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar. n = 10 experimentos, con 5 réplicas en cada uno. ANOVA de una vía, post-test Tukey ***p < 0.001, **p < 0.01 respecto al control; &&&p < 0.001, &&p < 0.01 respecto a SKF 38393, ###p < 0.001 respecto a sumanirole, &&&p < 0.001 respecto a PD 128,907 (en la gráfica C), ns sin diferencia estadística.

7.6 La dopamina endógena controla la liberación de glutamato a través de receptores *D₁-like* y *D₂-like*.

Para probar si la dopamina endógena tiene efectos similares a los de la dopamina exógena sobre los receptores *D₁-like* y *D₂-like* en el control de la liberación de glutamato, realizamos experimentos en rebanadas de SNr provenientes de ratas no reserpinizadas y evaluamos el efecto de las mismas concentraciones de SCH 23390 (100 nM) y sulpiride (100 nM) sobre la liberación de glutamato. Los resultados se muestran en la Fig. 14A. Como podemos observar, SCH 23390 disminuye de manera similar la liberación (55.1 ± 3.3 %) a lo que ocurría en rebanadas reserpinizadas (50.6 ± 2.8 %). También sulpiride incrementa la liberación de glutamato de manera similar (192.1 ± 2.7 %) que en rebanadas de rata reserpinizada (203.9 ± 4.8 %). Finalmente, la adición de ambos antagonistas a la preparación restablece la liberación a niveles del control (103.6 ± 2.7 %).

También evaluamos el efecto de los antagonistas selectivos de los receptores *D₂*, *D₃* y *D₄* sobre la liberación de glutamato por la dopamina endógena (Fig. 14B). El antagonista selectivo del receptor *D₂* L 741,626 (50 nM) produce una modesto, pero significativa contribución sobre la liberación (113.6 ± 1.2 %); como era esperado, el antagonista del receptor *D₃*, GR 103,691, incrementa la liberación de glutamato de manera muy importante (163.7 ± 4.1 %) y en mayor medida que el receptor *D₂*. Adicionalmente, el antagonista del receptor *D₄*, L 745,870 no modifica la liberación de glutamato (100.7 ± 1.0 %).

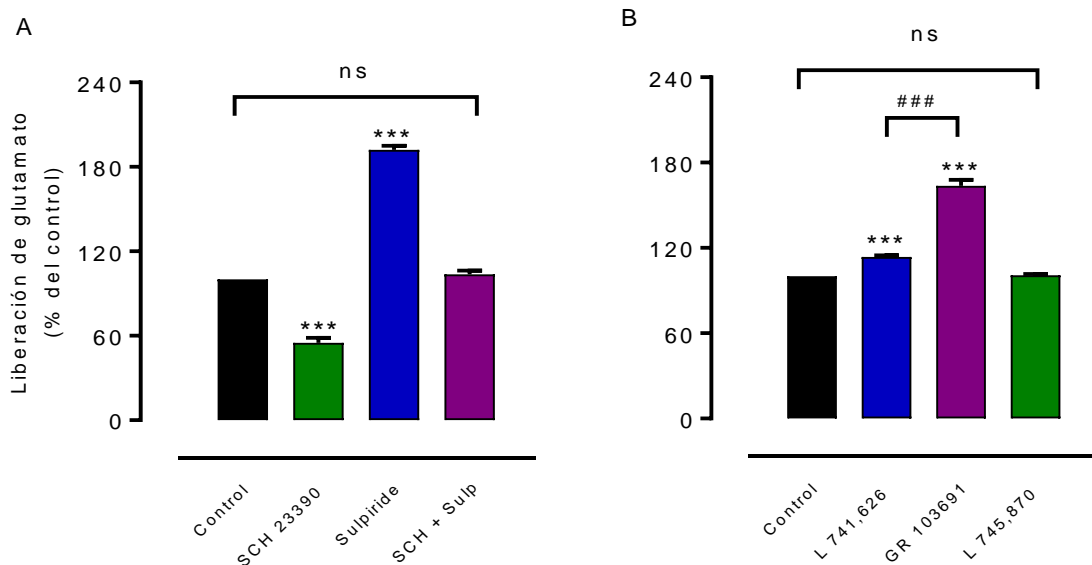


Fig. 14. La dopamina endógena activa a los receptores D_1 -like, D_2 y D_3 . **A.** Efecto del antagonista de receptores D_1 -like SCH 23390 (100 nM), del antagonista de receptores D_2 -like (100 nM) o ambos sobre la liberación de glutamato en rebanadas SNr de ratas no reserpinizadas. **B.** Efecto de los antagonistas selectivos del receptor D_2 L 741,626 (50 nM), del receptor D_3 GR 103,691 (10 nM) y del receptor D_4 L 745,870 (100 nM) sobre la liberación de glutamato en rebanadas de SNr de ratas no reserpinizadas. En ambos experimentos se representa la media de 10 experimentos independientes con 5 réplicas cada uno + el error estándar. ANOVA de una vía con un post-test de Tukey. *** $p < 0.001$, respecto al control, ### $p < 0.001$ respecto a L 741,626, ns no hay diferencia estadística.

7.7 El receptor D_3 disminuye la liberación de [3 H]-glutamato por una vía diferente a la AC-AMPC-PKA.

En sistemas heterólogos se ha encontrado que el receptor D_3 señala mediante la unión a proteínas Gai/o inhibiendo la actividad de la vía AC-AMPC-PKA (Zaworski *et al.*, 1999) la cual se ha relacionado con la liberación de neurotransmisores; por lo que es probable que esta vía esté involucrada en la disminución en la liberación de [3 H]-glutamato por el agonista PD 128,907. Para probar lo anterior, se adicionó un activador de la adenilato ciclasa (AC), forskolina (10 μ M), sola y en presencia de PD 128,907 (100 nM). Los resultados se muestran en la Fig. 15A. Se encontró que la forskolina incrementa la liberación de [3 H]-glutamato en un 40 % (140.2 ± 6.04 %) con respecto al control, cuando se coadiciona PD 128,907 y

forskolina, el agonista disminuye la liberación en un 39% respecto a la forskolina sola ($101.0 \pm 8.5 \%$); esta disminución no es diferente a la que se obtiene cuando se adiciona PD 128,907 solo (37%), respecto al control ($63.3 \pm 5.3 \%$). Este resultado sugiere que la vía AC-AMPC-PKA no participa de manera importante en el efecto del PD 128,907. Para comprobar nuestros hallazgos decidimos inhibir la actividad de la vía a nivel de la PKA con H-89 ($10 \mu\text{M}$) y evaluamos el efecto que tiene sobre la acción de PD 128,907 (100 nM). Como se puede observar en la Fig. 15B, la inhibición de la PKA con H-89, no modifica de manera significativa el efecto de PD 128,907 (PD $57.3 \pm 7.7 \%$, PD + H-89 $57.8 \pm 5.9\%$) y tampoco tiene efecto por sí solo ($92.0 \pm 8.8 \%$). Lo anterior nos permite sugerir que el receptor D_3 disminuye la liberación de glutamato por una vía diferente a la AC-AMPC-PKA.

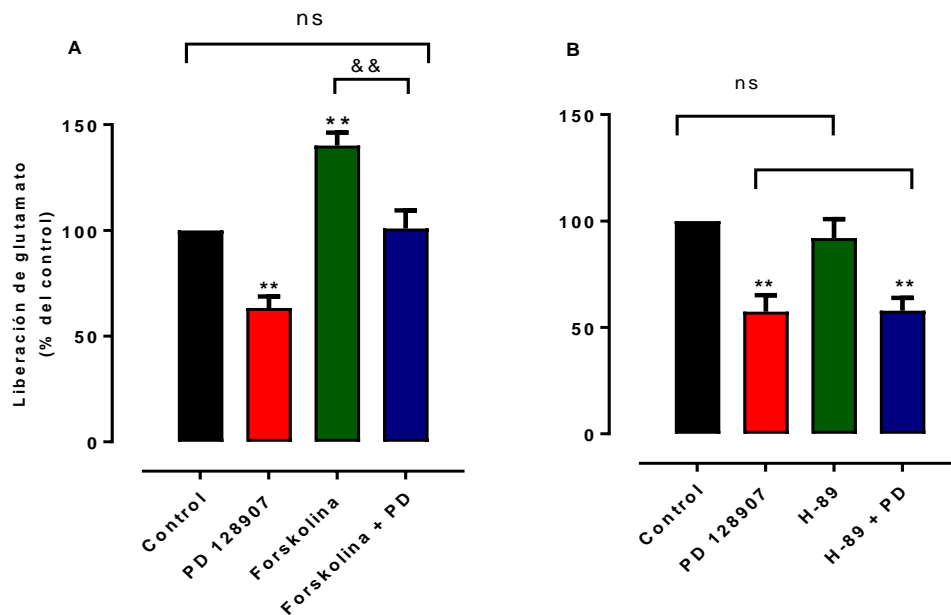


Fig. 15. La vía AC-AMc-PKA no está involucrada en el efecto del receptor D_3 . **A.** Efecto de la activación de los receptores D_3 con el agonista PD 128,907 (100 nM), de la activación de la adenilato ciclasa con Forskolina ($10 \mu\text{M}$) y de ambos en rebanadas de SNr de rata reserpinizada. **B.** Efecto de la activación de receptores D_3 con el agonista PD 128,907 (100 nM), efecto de la inhibición de la actividad de PKA con el inhibidor H-89 ($10 \mu\text{M}$) y efecto del agonista en presencia de H-89. En ambos experimentos se representa la media de 3 experimentos independientes con 5 réplicas cada uno + el error estándar. ANOVA de una vía con un post-test de Tukey. **p < 0.01 respecto al control, && p < 0.01 respecto a forskolina, ns no hay diferencia estadística.

7.8 Participación de los canales de calcio sobre el efecto de PD 128,907.

Continuando con la búsqueda de la vía de señalización del receptor D₃ se decidió explorar si los canales de calcio activados por alto voltaje (HVA) estaban involucrados. El NST expresa la mayoría de los canales de calcio (HVA): tipo P/Q, N y L (Song *et al.*, 2000). Los tipo P/Q y N son los que se han relacionado en mayor medida con la liberación de neurotransmisores (Carbone *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado que los canales tipo L también regulan la liberación de GABA en terminales estriado-estriatales (Recillas-Morales *et al.*, 2014); sin embargo, se ha reportado que es el canal de tipo N el que participa principalmente en la liberación de glutamato de neuronas subtálamicas (Song *et al.*, 2000). La primera maniobra consistió en probar si el receptor D₃ inhibía la actividad de canales de tipo P/Q, para este fin se utilizó el bloqueador selectivo ω -Agatoxina TK (1 μ M), solo y en presencia de PD 128,907. Como se observa en la Fig. 16A, ω -Agatoxina TK y PD 128907 (64.6 ± 2.9 %) tienen efectos aditivos disminuyendo la liberación (26.68 ± 2.5 %), la toxina disminuye la liberación por sí misma casi 50 % (51.8 ± 7.5 %); este resultado sugiere que el receptor D₃ no disminuye la liberación mediante el bloqueo de canales tipo P/Q.

El siguiente canal evaluado fue el tipo L, utilizamos el bloqueador nifedipino (10 μ M). A diferencia de los canales tipo P/Q, los canales L no modulan por sí mismos la liberación de glutamato (101.7 ± 3.8 %) (Fig. 16B) y su bloqueo tampoco modifica el efecto de PD 128,907 (PD 64.92 ± 1.4 %, PD + Nif 63.39 ± 2.8 %), por lo que podemos sugerir que no están involucrados en la disminución de la liberación producida por el receptor D₃.

Posteriormente, se investigó si canales de tipo N mediaban el efecto del receptor D₃. Para ello, los bloqueamos con ω -Conotoxina GVIA (1 μ M), sola y en presencia de PD 128,907 (100 nM). Como se puede observar en la Fig. 16C, ω -Conotoxina GVIA disminuye la liberación en casi 50 % respecto al control (53.78 ± 7.1 %), demostrando que este canal también participa en el control de la liberación de glutamato en la SNr. Al adicionar el PD 128,907 en

presencia de ω -Conotoxina GVIA se obtienen efectos oclusivos entre el bloqueador y el agonista (PD 60.4 ± 4.09 %, PD + Con 52.44 ± 6.2 %). Por lo que se sugiere que el receptor D₃ disminuye la liberación de glutamato mediante el bloqueo de canales de calcio dependiente de voltaje del tipo N.

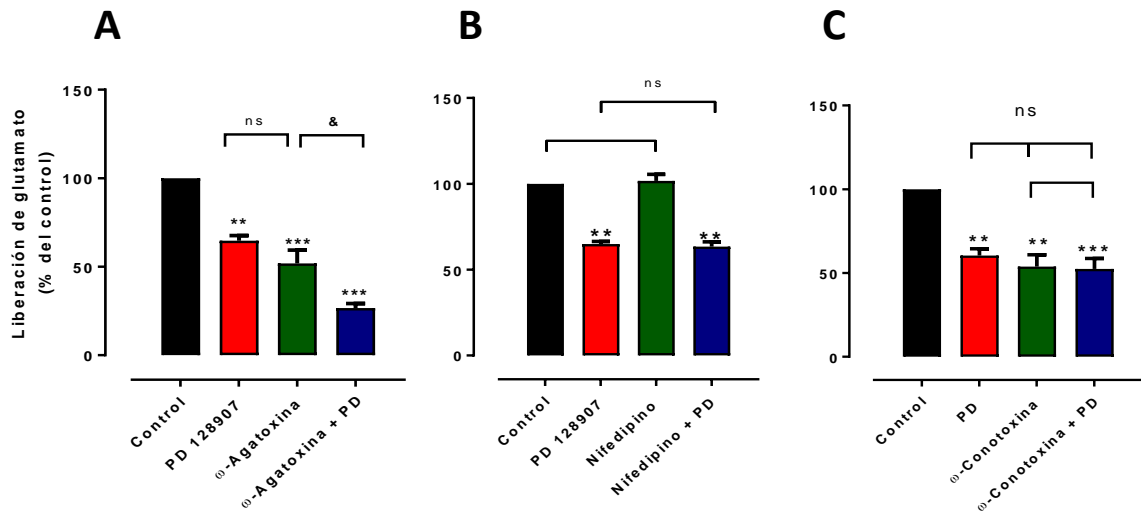


Fig. 16. El receptor D₃ disminuye la liberación de [³H]-glutamato a través de la inhibición de canales de calcio tipo N. Efecto de PD 128,907 (100 nM) en presencia de bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje. **A.** ω -Agatoxina TK (1 μ M), toxina adicionada durante la incubación de las rebanadas con el neurotransmisor radioactivo (30 min) para bloquear canales P/Q. **B.** Nifedipino (10 μ M), adicionado a partir de la fracción 3 y estuvo presente durante todo el experimento para bloquear canales L. **C.** ω -Conotoxina GVIA (1 μ M), adicionada durante la incubación de las rebanadas con neurotransmisor radioactivo para bloquear canales N. Se representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar, n = 3 experimentos, con 5 réplicas en cada uno. ANOVA de una vía, post-test Tukey **p < 0.01, ***p < 0.001 respecto al control &p < 0.05 respecto a ω -Agatoxina, ns sin diferencia estadística

7.9 El receptor D₃ señala mediante la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G

Se ha reportado que los receptores dopaminérgicos D₂-like puede inhibir la actividad de canales de calcio dependientes de voltaje de dos maneras: la primera mediante la unión directa de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G_{i/o} al canal de calcio, en particular al tipo N (Ramanathan *et al.*, 2008) y otra en la que participa la PLC β y segundos mensajeros (Hernandez-Lopez *et al.*, 2000). Para dilucidar si la subunidad $\beta\gamma$ participa en el efecto del receptor D₃

sobre los canales tipo N, inhibimos la unión de la subunidad $\beta\gamma$ con sus posibles efectores mediante la perfusión de galeína (10 μM) en presencia o ausencia de PD 128,907 (Fig. 17A). Podemos observar que la galeína no modifica la liberación de glutamato por sí sola ($100.3 \pm 2.3 \%$), pero cuando se coadiciona en presencia de PD 128,907, el efecto del agonista se previene (PD $62.35 \pm 2.9 \%$, PD + Gal $94.6 \pm 2.1 \%$), sugiriendo que la subunidad $\beta\gamma$ está involucrada en la vía de señalización del receptor D_3 .

Para evaluar si era mediante $\text{PLC}\beta$ que la subunidad $\beta\gamma$ disminuía la actividad de los canales de calcio adicionamos a la preparación U73122 (10 μM), con la finalidad de bloquear la actividad de las fosfolipasas C (Fig. 17B). Observamos que U73122 no tiene efecto sobre la liberación por sí mismo ($98.7 \pm 3.5 \%$) y tampoco modifica el efecto del receptor D_3 , cuando se coadiciona en presencia de PD 128,907 (PD $65.6 \pm 6.4 \%$, PD + U73122 $72.0 \pm 0.4 \%$). Por lo que es muy probable que sea mediante la unión directa de la subunidad $\beta\gamma$ al canal de calcio tipo N que el receptor D_3 inhiba la liberación de [^3H]-glutamato.

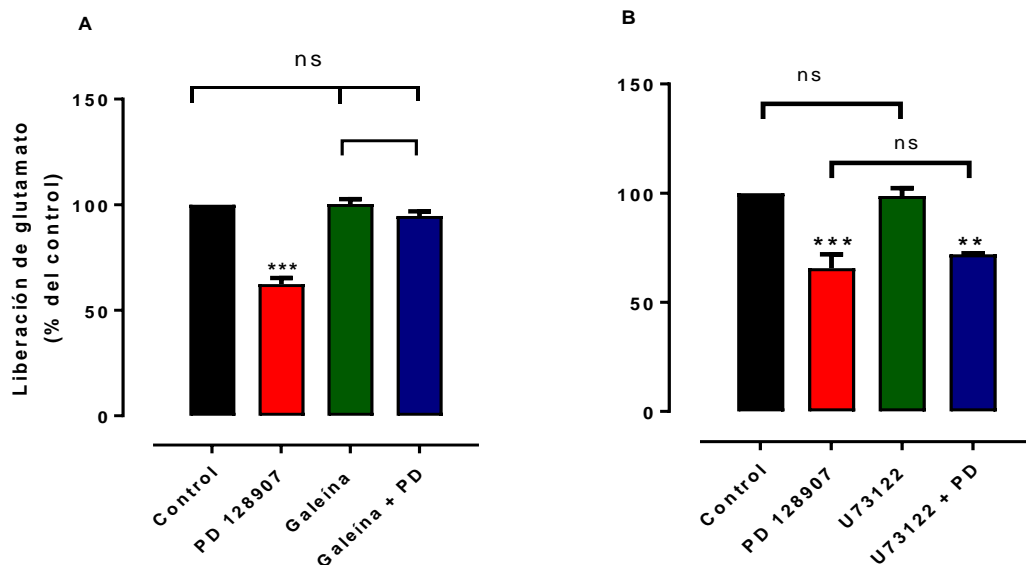


Fig. 17. El receptor D_3 inhibe la liberación de glutamato mediante la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G. **A.** Efecto de PD 128,907 (100 nM), de la inhibición de la subunidad $\beta\gamma$ con galeína (10 μM) y ambos. **B.** Efecto de PD 128,907 (100 nM), de la inhibición de la actividad de las fosfolipasas C

(incluida la PLC β) con U73122 (10 μ M) y ambos. En estos experimentos los inhibidores se adicionaron desde la fracción número 1. Se representa el promedio del porcentaje de la liberación + el error estándar. n = 3 experimentos, con 5 réplicas en cada uno. ANOVA de una vía, post-test Tukey ***p < 0.001, **p < 0.01 respecto al control; ns sin diferencia estadística.

7.10 La CaMKII no modula el efecto del receptor D₃.

Existe la posibilidad que la CaMKII module la actividad del receptor D₃ de manera similar a las terminales del estriado. Para probar lo anterior, se utilizó KN62 (4 μ M), un inhibidor de la CaMKII que se une directamente al sitio de unión de la calmodulina. Cuando se utiliza en presencia de PD 128,907 (100 nM), el KN62 no modifica de manera significativa la disminución en la liberación de [³H]-glutamato producida por el agonista en la SNr (PD 62.7 \pm 2.3 %, PD + KN 49.7 \pm 8.5 %) (Fig. 18A) y por sí solo no tiene efecto significativo sobre la liberación (93.6 \pm 12.9 %). A pesar de que no se encontró una interacción funcional, podría existir una interacción de las proteínas a nivel físico, para responder esta pregunta decidimos realizar experimentos de coimmunoprecipitación utilizando homogenados totales de NST en condiciones basales y de despolarización (30 mM de KCl) y comparar la respuesta con la obtenida en estriado. En la Fig. 18B podemos observar que no existe una interacción física entre la CaMKII α y el receptor D₃, aun después de la entrada masiva de calcio por la despolarización. Con los resultados obtenidos se sugiere que la CaMKII no modula la liberación de glutamato en la terminal subtálamo-nigral y no se une directamente al receptor D₃ para inhibir su función.

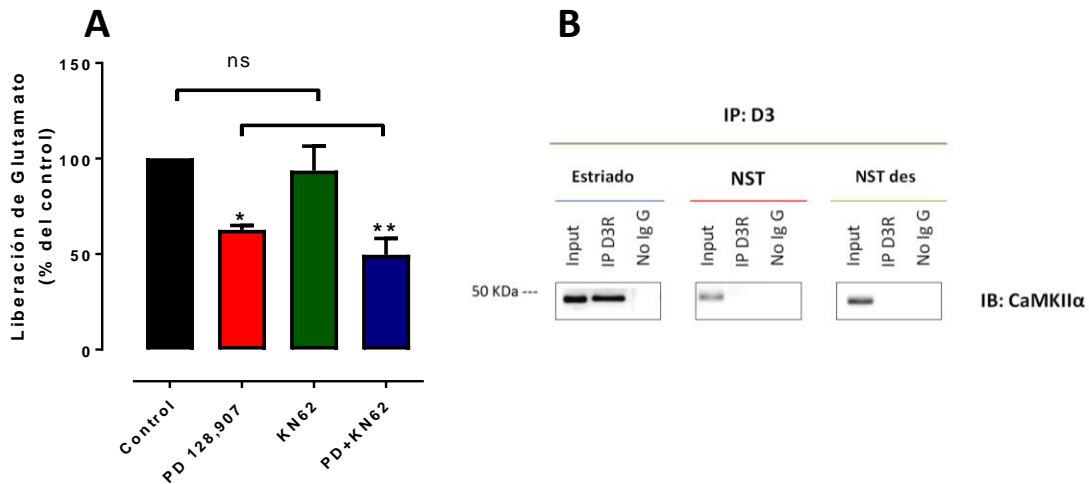


Fig. 18. La CaMKII no modula el efecto del receptor D₃ sobre la liberación de [³H]-glutamato en la SNr. **A.** Gráfica del experimento de liberación que muestra el efecto de la inhibición de la CaMKII con KN62 (4 μM) sobre el receptor D₃ activado con PD 128, 907 (100 nM). **B.** Imagen representativa de tres *immunoblots* usando anticuerpos para el receptor D₃ y CaMKIIα de tejido total proveniente de estriado y NST normal y despolarizado durante 10 min con 30 mM de KCl. *Input*: corresponde a 30 μg de homogenado total. *IPD₃R*: Tejido total (500 μg proteína) incubado con anticuerpo inmunoprecipitante contra el receptor D₃. *No IgG*: sin el anticuerpo para inmunoprecipitar. Membrana incubada con el anticuerpo para CaMKIIα total. En A se representa la media de 3 experimentos independientes con 5 réplicas cada uno + el error estándar. ANOVA de una vía con un post-test de Tukey, *p < 0.05, **p < 0.01 respecto al control, ns no hay diferencia estadística.

7.11 La denervación potencia el efecto del receptor D₃

La denervación dopaminérgica produce cambios en la vía de señalización del receptor D₃ en la terminal estriado-nigral (Avalos-Fuentes *et al.*, 2015); para investigar si en la terminal subtálamo-nigral también los había, se procedió a lesionar ratas en el haz medial del cerebro anterior con la neurotoxina 6-OHDA de manera unilateral y se construyó una curva concentración-respuesta en presencia de PD 128,907 (Fig. 19A). El efecto máximo (Emax) del agonista se incrementa en condiciones de denervación respecto a la obtenida para la rata reserpinizada pasando de 45 % (Emax = 45.4 ± 5.9 %) a casi 70% (Emax = 70.3 ± 8.6 %), $p = 0.04$ $n = 4$. Mientras que la EC₅₀ no presenta cambios significativos con la denervación (EC₅₀ reserpinizada 5.9

nM, $\log EC_{50} = -8.2 \pm 0.2$; EC_{50} denervada 1.1 nM, $\log EC_{50} -9.0 \pm 0.4$; $p = 0.15$ $n = 4$. Para evaluar que el receptor D_3 era el responsable del efecto del PD 128,907, se utilizó el antagonista GR 103091 (10 nM) solo y en presencia de PD 128,907 (Fig. 19B). En estas condiciones, el GR 103,691 no tiene efecto por sí mismo sobre la liberación ($116.6 \pm 3.7 \%$) y previene completamente la disminución en la liberación de $[^3H]$ -glutamato producida por PD 128,907 (PD $40.9 \pm 6.7 \%$, PD +GR $107 \pm 16.09\%$).

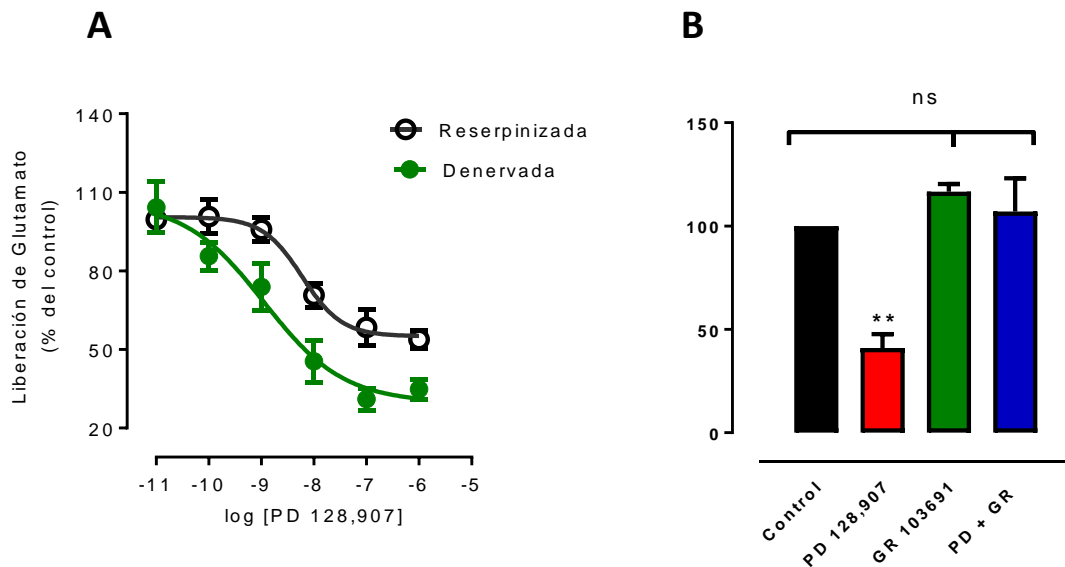


Fig. 19. Efecto de la denervación sobre el receptor D_3 en la liberación de $[^3H]$ -glutamato en rebanadas de SNr. A. Curvas concentración respuesta del efecto de PD 128,907 sobre la liberación de $[^3H]$ -glutamato en rebanadas de SNr del lado lesionado (círculos verdes) y en rebanadas de SNr reserpinizadas (círculos blancos). Cada punto en la curva de color verde representa el promedio de 4 experimentos \pm el error estándar con 5 réplicas cada uno, la curva en color negro (círculos blancos) representa el ajuste de la gráfica de la Fig. 10B correspondiente al efecto de PD 128,907 en rata reserpinizada. **B.** El antagonista del receptor D_3 GR 103691 (10 nM) previene completamente el efecto de 100 nM de PD 128,907 en la rata denervada, por sí solo el antagonista no tiene efecto. Se representa el promedio de 3 experimentos + el error estándar con 5 réplicas cada uno, se realizó ANOVA de una vía, post-test de Tukey, ** $p < 0.01$ respecto al control, ns sin diferencia estadística.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo utilizamos la liberación de [³H]-glutamato inducida por alto K⁺ en rebanadas de sustancia nigra reticulada de rata para profundizar en el estudio del control de la liberación de glutamato por los receptores dopaminérgicos subtálamo-nigrales. Explorando los siguientes aspectos: 1) el perfil farmacológico de la dopamina y de los agonistas selectivos; 2) la contribución relativa de los receptores dopaminérgicos, 3) la interacción funcional entre ellos, 4) la vía de señalización del receptor D₃ y modulación por la CaMKII, 5) efecto de la denervación sobre la inhibición producida por el receptor D₃. Nuestros resultados comprueban que los receptores D_{1-like}, D₂ y D₃ modulan la liberación de glutamato en las terminales subtálamo-nigrales; pero su contribución relativa es diferente, mientras que el receptor D₄ no participa. D_{1-like} y D₃ estimulan e inhiben la liberación, respectivamente, en mayor grado que la inhibición producida por los receptores D₂. Pero es activando al receptor D₃ que la dopamina tiene la mayor potencia (EC₅₀) comparado con los receptores D_{1-like} y D₂. Los tres receptores interactúan entre sí: los receptores D₂ y D₃ antagonizan a los receptores D_{1-like}, mientras que los receptores D₂ y D₃ tienen efectos aditivos. Finalmente, el efecto inhibitorio del receptor D₃ está mediado por la unión directa de la subunidad βγ de las proteínas G a los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo N, la CaMKII no modula su efecto y la denervación potencia la inhibición producida por este receptor.

Consideraciones metodológicas

Al utilizar la técnica de liberación de neurotransmisores radioactivos inducida por alto K⁺, se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos: 1) el origen del neurotransmisor; 2) un posible efecto de supersensibilización de los receptores producida por la reserpina, 3) diferencias entre la activación de los receptores con dopamina exógena comparada con la endógena, 4)

probable interacción de los neurotransmisores liberados por la alta concentración K^+ .

Respecto al origen de la liberación de glutamato, la SNr recibe aferencias glutamatérgicas desde la corteza (Kornhuber *et al.*, 1984; Naito y Kita, 1994), núcleo pedúnculo pontino (Takakusaki *et al.*, 1996), la zona incerta (Heise y Mitrofanis, 2004) y el núcleo subtálmico (Parent y Hazrati, 1995). Siendo el núcleo subtálmico el que contribuye en mayor porcentaje a la liberación de este neurotransmisor en la SNr (Kornhuber *et al.*, 1984; Parent y Hazrati, 1995), esto se ha demostrado al lesionar el NST con ácido kaínico y observar una reducción del 80% en el contenido de glutamato en la SNr (Rosales *et al.*, 1997).

Se ha reportado que la reserpina puede causar una supersensibilización o modificación de los receptores dopaminérgicos; sin embargo, esto se ha producido en mayor medida en condiciones de reserpinización crónica o a largo plazo (Creese *et al.*, 1977; Rubinstein *et al.*, 1990). En la administración aguda, la reserpina no modifica la afinidad o el número de receptores de los receptores *D₂-like* (Chipkin *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1992); tampoco modifica la afinidad de los receptores *D₁-like*, pero si se ha descrito un incremento del 18% en el número de receptores después de 24 horas de reserpinización (Chipkin *et al.*, 1987). Nuestros experimentos se llevaron a cabo después de 18 horas de la administración aguda de reserpina por lo que la probabilidad de que el fármaco produjera modificación en los receptores *D₂-like* es muy baja. Respecto a los receptores *D₁-like*, existe la posibilidad de que la reserpina pudiera producir algún cambio en el número de receptores; sin embargo, el número de horas transcurridas entre la aplicación de la reserpina y la realización de nuestros experimentos es menor a 24 horas, por lo que es posible que no haya incremento significativo en el número de receptores *D₁-like* y dado que el efecto de los antagonistas de los receptores *D₁-like* y *D₂-like* es similar en presencia de dopamina endógena como exógena consideramos que el protocolo de reserpinización

que empleamos produce pocos cambios en la sensibilidad de los receptores, por lo tanto, efectivamente la dopamina endógena activa de manera similar a los receptores que la dopamina exógena.

Finalmente, la estimulación con alto K^+ puede producir la liberación de otros neurotransmisores, no sólo del glutamato marcado, que a su vez podrían activar receptores presinápticos. En el caso de la reserpinización, la disminución del contenido de dopamina es mayor al 92 % (Nava-Asbell *et al.*, 2007), lo que reduce la probabilidad de interacción entre dopamina con glutamato (Mintz *et al.*, 1986; Rosales *et al.*, 1994) o dopamina con GABA (Reubi *et al.*, 1977; Aceves *et al.*, 1995). Sin embargo, una interacción glutamato-GABA producida por efectos de la dopamina exógena no puede ser descartada; la modulación de la liberación de glutamato por GABA está limitada a receptores $GABA_B$ (Cortes *et al.*, 2010), ya que la presencia de receptores presinápticos $GABA_A$ no ha sido descrito en estas terminales. La presencia de SCH 23390 previene el efecto estimulador de la dopamina sobre la liberación de GABA por activación del receptor D_1 -like en los experimentos en los cuales estudiamos el efecto de receptores D_2 -like sobre la liberación de glutamato. Entonces, sólo la liberación de GABA inducida por alto K^+ y por estimulación directa del receptor D_1 -like con SKF 38393 o dopamina exógena puede modificar la liberación de glutamato a través de receptores $GABA_B$. Al respecto, si existiera una modulación significativa de GABA sobre la liberación de glutamato, la presencia de un antagonista de los receptores $GABA_B$ debería incrementar la liberación de glutamato; sin embargo, esto no sucede bajo nuestras condiciones experimentales; como se ha demostrado en estudios previos, llevados a cabo en condiciones similares (reserpinización y despolarización), el antagonista de los receptores $GABA_B$, saclofen, no incrementa la liberación de glutamato en condiciones de despolarización o con activación de receptores D_1 -like (Cortes *et al.*, 2010); sin embargo, el agonista de los receptores $GABA_B$, baclofen si tiene efecto, reduciendo la liberación de glutamato (la pérdida del efecto de los receptores

GABA_B siendo activados por GABA endógeno es difícil de explicar). Por lo anterior, podemos sugerir que las interacciones entre neurotransmisores parecen ser mínimas bajo estas condiciones de experimentación.

Farmacología de los receptores dopaminérgicos que controlan la liberación de glutamato.

La afinidad es un parámetro que puede ser comparado con la potencia evaluada como EC₅₀ (pero teniendo en cuenta que la relación no es necesariamente lineal) (Neubig *et al.*, 2003) y la magnitud del efecto con la eficacia evaluada como E_{max}. La dopamina activa a sus receptores con diferentes rangos de afinidades dependiendo el tipo celular y estado de afinidad de los receptores: para el receptor *D*₁-like desde 0.9 a 2340 nM y para la familia *D*₂-like de 4 a 474 nM (Vallone *et al.*, 2000). En nuestro estudio, las EC₅₀ de la familia *D*₁-like (1131 nM) y *D*₂-like (251 nM) se encuentran dentro de los rangos reportados en la bibliografía. Adicionalmente, el orden de magnitud de las EC₅₀ para los subtipos de receptores *D*₂ (797 nM) y *D*₃ (65.1 nM) son similares a los reportados: *D*₂ (2.8 a 474 nM) y *D*₃ (4 a 27 nM) (Vallone *et al.*, 2000). Respecto a las EC₅₀ encontradas para los agonistas selectivos, son de rangos similares a las afinidades reportadas en la literatura: para el SKF 38393 (EC₅₀ 3.1 nM), comparada con la afinidad reportada de 26.6 nM (Neumeyer *et al.*, 2003); PD 128,907 (EC₅₀ 5.9 nM) comparada con la afinidad reportada de 1-2.3 nM (Akunne *et al.*, 1995; Pugsley *et al.*, 1995), finalmente el sumanirole tiene una EC₅₀ de 4.0 nM y una afinidad reportada de 9.01 nM (McCall *et al.*, 2005). Adicionalmente, los antagonistas selectivos para los receptores *D*₁-like, *D*₂ y *D*₃ previnieron los efectos tanto de la dopamina, como de los agonistas selectivos respectivos en los rangos esperados, soportando la idea de que los receptores presinápticos que controlan la liberación de glutamato podrían poseer afinidades correspondientes a cada subtipo. En nuestro trabajo no evaluamos las constantes farmacológicas para los receptores activados por dopamina endógena, pero encontramos similitudes cuando se activan los

receptores con dopamina en rata reserpinizada y cuando se antagonizan en rebanadas provenientes de animales no reserpinizados (Fig. 9B y 14A); sin embargo, se requiere hacer los experimentos pertinentes para comprobar lo anterior. Pero los datos obtenidos hasta el momento nos permiten sugerir que los receptores son activados de manera similar en condiciones de reserpinización y de no reserpinización.

Comparación de la contribución relativa de los diferentes subtipos de receptores al control de la liberación de glutamato.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la activación de los receptores *D₁-like* parece contribuir de manera más importante al control de la liberación de glutamato que la activación de los receptores *D₃*. Esto coincide con experimentos de microdiálisis *in vivo* en los que la liberación de dopamina (producida por la activación de receptores NMDA) incrementa la liberación de glutamato y GABA en la sustancia nigra reticulada mediante la activación de receptores *D₁-like* (Rosales *et al.*, 1997). Esta diferencia puede deberse a que la expresión de los receptores *D₁-like* es mayor que la de los receptores *D₃* en el NST, lo cual podría verse reflejado en las terminales (Flores *et al.*, 1999). Sin embargo, aun cuando el efecto del receptor *D₃* es menor al receptor *D₁-like*, la dopamina tiene gran afinidad por el receptor *D₃* nigral que se refleja como mayor potencia sobre la liberación de glutamato, permitiendo su activación a concentraciones mucho más bajas comparadas con el receptor *D₁-like*. Así, durante los cambios en los niveles de dopamina intersticial; los niveles bajos activarían principalmente el receptor *D₃*, inhibiendo la liberación, mientras que durante un aumento elevado en la dopamina intersticial se activarían los receptores *D₁-like*, incrementando la liberación de glutamato. Este efecto proporcionaría un mecanismo de regulación fina para la liberación de glutamato, modificando la intensidad de la señal de glutamato que modula la frecuencia de disparo de neuronas

GABAérgicas (Robledo y Feger, 1990), y por lo tanto el comportamiento motor.

Respecto al mayor efecto del receptor D_3 con respecto al receptor D_2 sobre la liberación de glutamato, no se explicaría con una mayor expresión de receptores D_3 en el subtálamo, ya que se ha observado que las neuronas subtálamicas expresan el ARNm de los receptores D_2 y D_3 en niveles similares (Bouthenet *et al.*, 1991; Ramanathan *et al.*, 2008) y mediante estudios de RT-PCR de célula única se ha demostrado la coexpresión de ambos mensajeros en la misma neurona, con una expresión relativamente mayor para el receptor D_2 (Ramanathan *et al.*, 2008). De manera similar se han encontrado mayores niveles de unión a radioligandos para el receptor D_2 en el núcleo subtálmico (Flores *et al.*, 1999), y se esperaría una expresión similar en las terminales. Por lo anterior, explicar el mayor efecto del receptor D_3 es difícil, pero podría estar relacionado con los valores estimados para EC_{50} y E_{max} que tiene la dopamina sobre este receptor comparado con el receptor D_2 . La menor EC_{50} para el receptor D_3 indica una mayor afinidad relativa, lo cual se traduciría en una activación preferencial del receptor D_3 sobre D_2 a bajas concentraciones de dopamina, y además la dopamina es más eficaz activando a los receptores D_3 como lo indica su E_{max} (ver tabla 2). En la inhibición de la liberación producida a concentraciones elevadas de dopamina, aun cuando el receptor D_2 se encuentra totalmente activo, debido a su menor eficacia comparada con el receptor D_3 , la mayor parte de la inhibición estaría mediada por este último. Otra posibilidad es que la cantidad de proteína del receptor D_2 que es trasladada a las terminales subtalamo-nigrales sea menor a la del receptor D_3 . Se requieren más estudios para evaluar lo anterior.

Por otro lado, aparentemente el receptor D_4 no participa en el control presináptico de la liberación de glutamato en el SNr. Esto coincide con la ausencia de ARNm reportada para este receptor en el NST (Flores *et al.*, 1999; Ramanathan *et al.*, 2008), la falta de efecto de los agonistas del

receptor D₄ sobre corrientes de canales de calcio Ca_v2.2 en neuronas subtálamicas (Ramanathan *et al.*, 2008) y sobre la liberación de glutamato en el pálido externo desde terminales subtálamicas (Hernandez *et al.*, 2006). Sin embargo, nuestros resultados se contraponen a los reportados por Shen *et al.*, 2012, en los que el receptor D₄ disminuye de manera significativa la amplitud de EPSCs de origen glutamatérgico producidas por estimulación local de la SNr. Debido que el NST no posee receptores D₄, es posible que la estimulación local esté activando receptores D₄ presentes en otras aferentes de la SNr. Se ha demostrado que este receptor puede modular la liberación de GABA tanto en el NST como en la SNr (Floran *et al.*, 2004; Acosta-Garcia *et al.*, 2009) y que circuitos locales pueden producirse en la SNr (Brown *et al.*, 2014), lo que favorecería la modulación de glutamato de manera indirecta. Otra posibilidad es que la estimulación local esté activando al receptor D₄ presentes en las terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza (Rivera *et al.*, 2008); sin embargo, debido a que el NST contribuye en casi el 80% a la liberación de glutamato en la SNr (Cortes *et al.*, 2010), se reduce la importancia de la entrada glutamatérgica cortical y por lo tanto un efecto de los receptores D₄ corticales presinápticos en la SNr.

Interacción entre receptores

En nuestro trabajo encontramos una interacción antagónica de los receptores D₂ y D₃ con el receptor D_{1-like}. Esto podría tener diferentes explicaciones, una de ellas podría ser un “cross talk” a nivel de vías de señalización ya que el receptor D_{1-like} se acopla a proteínas G_s y los receptores D₂ y D₃ se acoplan a proteínas G_i, lo que produciría efectos opuestos sobre la actividad de la adenilato ciclasa, canales de Ca²⁺ y por lo tanto la liberación de neurotransmisores (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Otra posibilidad es que los receptores sean expresados en diferentes terminales y que veamos la suma algebraica de los efectos, ya que la liberación que medimos es la de todas las terminales. Finalmente, podría ocurrir una interacción dimérica

cuyo resultado final es un efecto antagónico. Aun cuando no se ha reportado la expresión para mensajeros o proteínas del receptor *D₁-like* con *D₂* o *D₃* en la misma neurona subtálmica, Ibañez-Sandoval *et al.*, en el 2016 demostró una interacción presináptica antagónica entre los agonistas *D₁-like* y *D₂-like* sobre corrientes glutamatérgicas registradas en una neurona única nigral, sugiriendo que es posible una coexpresión de receptores *D₁-like* con los *D₂* o *D₃* y por lo tanto la formación de un dímero. Al respecto, se ha sugerido que el efecto potenciador del receptor *D₃* estriado-nigral sobre el receptor *D₁* incrementando la liberación de GABA en la SNr (Avalos-Fuentes *et al.*, 2013; Cruz-Trujillo *et al.*, 2013) es producido por la formación de un dímero *D₁-D₃* (Fiorentin *et al.*, 2008; Marcellino *et al.*, 2008). Esta interacción muestra un efecto atípico en la vía de señalización del receptor *D₃* como miembro de la familia *D₂-like*, que contrasta con la interacción antagónica encontrada en nuestro trabajo en la que el receptor *D₃* tiene una vía de señalización típica observada en el núcleo Accumbens e islas de Calleja (Griffon *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1998), indicando que la interacción *D₁/D₃* es neurona específica.

Por otro lado, el efecto aditivo encontrado entre los receptores *D₂* y *D₃* podría deberse a que los receptores se están expresando en la misma neurona (ya que se ha localizado el ARNm de ambos receptores en una célula única de NST) y que ambos receptores estén señalizando a través de la misma vía. Además de la vía AC-AMPC-PKA, se ha reportado que los receptores somáticos *D₂-like* señalizan por modulación de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N a través de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (Ramanathan *et al.*, 2008). Como demostramos en el presente trabajo, el receptor *D₃* subtálmico señala mediante el bloqueo de canales de calcio de tipo N y su efecto no es modificado por el bloqueo de PLC o adenilato ciclasa, indicando que la subunidad $\beta\gamma$ media el efecto del receptor *D₃*. Por lo que la posibilidad de que el receptor *D₂* y el receptor *D₃* sean expresados en

la misma neurona y señalicen a través de la misma vía (subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G) es altamente probable.

Receptor D₃: efecto por sí mismo sobre la liberación.

El efecto del receptor D₃ sobre la liberación de glutamato difiere del encontrado en la terminal estriado-nigral sobre la liberación de GABA, reportado por Ávalos-Fuentes *et al.*, 2015; en su trabajo el receptor D₃ no tiene efectos por sí solo sobre la liberación de GABA cuando se utilizan animales reserpinizados, la explicación de esta diferencia no es clara. Una posibilidad es que exista alguna variante en la estructura del receptor D₃ presente en la terminal subtálamo-nigral con respecto al que se localiza en las terminales estriado-nigrales que le permitiera señalar por sí mismo; sin embargo, ninguna diferencia estructural ha sido reportada hasta el momento. Una segunda posibilidad es que la pérdida de modulación del receptor D₃ subtálamico por parte de la CaMKII, como observamos en la Fig. 18, le permita señalar sin la activación del receptor D₁ observada en terminales estriatales. A su vez, la falta de inhibición del receptor D₃ por la CaMKII podría deberse a que la isoforma de la CaMKII mayormente expresada en el NST es la β (Ochiishi *et al.*, 1994) y no la CaMKII α que es la encargada de regular el efecto del receptor D₃ en el soma y terminales del estriado (Liu *et al.*, 2009; Avalos-Fuentes *et al.*, 2015). Además de la CaMKII, otra proteína ejerce un control negativo sobre el receptor D₃ en el estriado: su isoforma D_{3nf}. En neuronas estriatales se ha observado que al incrementarse la relación D₃/D_{3nf}, al disminuir la expresión de D_{3nf}, se favorece la señalización del receptor D₃ (Elmhurst *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 2011). Entonces, si en las terminales subtálamicas el receptor D₃ está interactuando en menor medida a como lo hace en el estriado o incluso que no haya interacción con su isoforma D_{3nf} esto permitiría que el receptor D₃ se desinhiba y señalice,

modificando la liberación de glutamato. Más experimentos son requeridos para probar esta hipótesis.

Otra posibilidad es que el receptor D₃ tiene efecto por sí mismo dependiendo de la naturaleza de la neurona en la que se exprese; las neuronas del NST presentan actividad tónica de potenciales de acción (Chetrit *et al.*, 2013), mientras que las neuronas del estriado no la presentan (Squire *et al.*, 2008). De forma que en las neuronas subtálamicas podría ser necesario disminuir la liberación de glutamato tónica sobre la sustancia nigra reticulada y el receptor D₃ presente en las terminales podría participar en este control fino de la liberación, favorecido por la gran afinidad de la dopamina por este receptor; en el estriado, al no existir actividad tónica este control no sería requerido.

Receptor D₃: vía de señalización

En la vía de señalización del receptor D₃ de la terminal subtálamo-nigral dilucidada en nuestro trabajo, la vía AC-AMPC-PKA no parece tener un papel relevante, a diferencia de lo que ocurre con el receptor D₃ de las terminales estriado-nigrales sobre la liberación de GABA que señala a través de esta vía (Avalos-Fuentes *et al.*, 2015). Al respecto, es posible que la vía AC-AMPC-PKA no está tónicamente activa en el NST modulando la liberación de glutamato; experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo (Cortés *et al.*, 2010) demostraron que al adicionar H-89 (inhibidor de la actividad de la PKA) a rebanadas de SNr de rata reserpinizada no se modifica la liberación de glutamato con respecto al control, esto coincide con la ausencia de efecto de H-89 reportado en nuestro trabajo (Fig. 17). Esta falta de efecto, podría deberse a que la concentración utilizada no sea suficiente para inhibir a la PKA, ya que no se tuvo un grupo experimental en el que se activará a la Adenilato ciclasa en presencia de H-89. Sin embargo, Cortés *et al.*, en el 2010 observó que H-89 en condiciones similares a las nuestras, disminuye el

incremento en la liberación de glutamato producido por la activación de la adenilato ciclasa por el receptor D₁, sugiriendo que el fármaco efectivamente está inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa, pero sin efectos tónicos.

De acuerdo a nuestros resultados, el receptor D₃ subtálamo-nigral modifica la liberación de glutamato mediante la inhibición de canales de calcio de tipo N, a través de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (Figs. 16 y 17). La vía de señalización dilucidada en nuestro trabajo coincide con la reportada (Ramanathan *et al.*, 2008), como se mencionó previamente, estos autores sugieren que los receptores somáticos D₂-like señalizan por modulación de canales Ca_v2.2 a través de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G en neuronas del núcleo subtálamico. A su vez también se ha demostrado que los GPCRs pueden inhibir directamente los canales de tipo N por la unión de subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G a la estructura del canal (DePuy *et al.*, 2006; Currie 2010), lo que refuerza nuestros resultados.

En el estudio de los canales de calcio y su relación con el receptor D₃, nifedipino estuvo presente durante todo el experimento de liberación, ya que es un bloqueador reversible de los canales L (Zhai y Ma., 1991). Los inhibidores ω -Agatoxina TK y ω -Conotoxina GVIA fueron adicionadas a las rebanadas durante el periodo de incubación con el neurotransmisor radioactivo y posteriormente removidas, si el bloqueo de estas toxinas fuera reversible existiría la posibilidad de que su efecto haya disminuido durante el experimento de liberación. Sin embargo, se ha reportado a ω -Agatoxina TK como un bloqueador irreversible de los canales P/Q y se ha utilizado a concentraciones y tiempos de incubación similares a los nuestros en experimentos de liberación (Arias-Montano *et al.*, 2007). Respecto a ω -Conotoxina GVIA, Boland *et al.*, 1994 sugiere que el bloqueo de canales N con esta toxina es parcialmente reversible y el proceso comienza a revertirse a los 70 minutos después de retirarla. En nuestro protocolo, el término del experimento de liberación se produce 70 minutos después de retirar la

toxina; por lo que es probable que no haya una disminución significativa del bloqueo.

Modificación del efecto del receptor D₃ producida por la denervación.

La denervación parece modificar el efecto del agonista D₃ sobre la liberación; este efecto podría deberse a cambios en los parámetros farmacológicos (como afinidad, potencia o incremento en la expresión del receptor) o bien por cambios río abajo en la vía de señalización del mismo. Respecto a la afinidad, no hay diferencia significativa entre la EC₅₀ obtenida en la rata reserpinizada (5.9 nM) y la EC₅₀ en la rata denervada (1.1 nM), sugiriendo que probablemente no hay cambios importantes en la afinidad del receptor por su ligando. Sin embargo, se requieren experimentos de *binding* para comprobar lo anterior. Un aumento en la expresión de receptores D₃ podría ser posible, Sun *et al.*, 2010 reporta un incremento en el *binding* para receptores de la familia D_{2-like} en ratas lesionadas con 6-OHDA en el haz del cerebro medio en estados tempranos (4 semanas) después de la lesión; sin embargo, la mayoría de los estudios concuerdan en una disminución en la expresión del receptor D₃ en modelos animales con denervación dopaminérgica e incluso en pacientes con la EP (Doudet *et al.*, 2000; Guillin, *et al.*, 2001).

El efecto observado también puede deberse a cambios en la vía de señalización del receptor río abajo; Prieto *et al.*, en el 2011 reportó que el receptor D₃ presente en neuronas estriatales sufre cambios en la vía de señalización después de la lesión unilateral con 6-OHDA en la SNc de ratas. En los animales sanos, el receptor D₃ señala inhibiendo la actividad de canales de calcio dependiente de voltaje del tipo L a través de la activación de PP2B; sin embargo, después de la lesión con la neurotoxina, se produce una disminución de la interacción del receptor D₃ con su isoforma D_{3nf}, favoreciendo la cantidad de receptores D₃ “libres”. Éstos se localizarían cerca de los canales de calcio de tipo P/Q inhibiéndolos mediante la activación de

PLC y degradación de PIP2 (Prieto *et al.*, 2011; Prieto 2017). Si bien nuestros resultados sugieren que en la rata reserpinizada el receptor D₃ inhibe la liberación de glutamato a través de bloqueo de canales de calcio de tipo N y no del tipo L; se puede observar que el canal de tipo P/Q también controla de manera significativa la liberación de glutamato, por lo que podría ser posible que después de la denervación, éstos también sean blanco de inhibición de los receptores D₃. La denervación incrementaría el número de receptores D₃ subtálamo-nigrales libres al disminuir la interacción D₃-D_{3nf}, estos receptores libres se encontrarían cercanos a los canales de tipo P/Q y podrían inhibirlos de manera similar a lo sugerido por Prieto *et al.*, 2011, explicando así la potenciación sobre la liberación de glutamato. Más experimentos son requeridos para probar lo anterior.

Implicaciones en el comportamiento motor en el estado sano.

Los agonistas del receptor D₃ disminuyen la actividad locomotora, mientras que los antagonistas del mismo receptor la incrementan cuando son administrados sistemáticamente en una rata sana en movimiento (Pritchard *et al.*, 2007; Guitart-Masip *et al.*, 2008). La SNr contiene receptores D₃ presentes en las dendritas de la SNc (Diaz *et al.*, 2000), en las aferentes estriado-nigrales (Cruz-Trujillo *et al.*, 2013) y aferentes subtálamicas glutamatérgicas (Shen y Johnson 2012). Por lo que los efectos de los agonistas del receptor D₃ podrían ocurrir en cualquiera de los sitios mencionados.

El receptor D₃ presente en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc son autorreceptores que modulan la liberación de dopamina y determinan el efecto motor. Un incremento en los niveles intersticiales de dopamina por la activación del receptor D₃ podría disminuir la actividad motora; sin embargo, esto ha sido cuestionado debido a que los picos en la disminución de la liberación de dopamina no correlaciona con cambios en la actividad motora (Waters *et al.*, 1993; Svensson *et al.*, 1994). Por otro lado, la

activación del receptor D₃ en las terminales estriado nigrales potencia la liberación de GABA mediada por el receptor D_{1-like} (Cruz-Trujillo *et al.*, 2013) e incrementa el movimiento en animales reserpinizados (Marcellino *et al.*, 2008); lo que no es compatible con la disminución en la actividad motora observada en la administración sistémica de agonista de receptores D₃ en sujetos normales.

Respecto a los receptores D₃ de las terminales glutamatérgicas. La disminución de liberación de glutamato a nivel nigral producido por la activación del receptor D₃ como un único mecanismo para explicar el comportamiento motor no es posible, porque la disminución de la liberación produciría la disminución en el disparo de las neuronas de proyección GABAérgica de la SNr (Shen y Johnson, 2006), incrementando la actividad de las neuronas tálamo-corticales e incrementando la actividad locomotora. Entonces es probable que exista un mecanismo alternativo o que el efecto de los agonistas sistémicos del receptor D₃ no esté mediado por terminales nigrales. Un mecanismo alternativo implicaría una relación entre receptores D_{1-like} y D₃ subtálamo-nigrales y una interacción recíproca entre glutamato, dopamina y GABA (Rosales *et al.*, 1997) en la SNr dado que las proyecciones subtálamo-nigral y estriado-nigral pueden converger en la misma neurona de la SNr (Bevan *et al.*, 1994). En este caso la liberación de glutamato desde las terminales subtálamo-nigral induciría la liberación de dopamina por la activación de los receptores NMDA presentes en las dendritas dopaminérgicas. La liberación de dopamina podría incrementar la liberación de GABA en la SNr por activación de receptores D_{1-like} en aferentes estriado-nigrales y a la vez favorecer mayor liberación de glutamato por activación de los receptores D_{1-like} presentes en las terminales subtálamo-nigrales, reforzando el efecto de glutamato sobre la liberación de GABA y dopamina que produciría disminución de la actividad de la SNr y por lo tanto incremento de la actividad locomotora (Rosales *et al.*, 1997). Al adicionar al receptor D₃ en el microambiente anterior, la activación de receptores D₃ subtálamicos por dopamina o por sus agonistas contrarrestaría

los efectos del receptor *D₁-like* sobre la liberación de glutamato, disminuyendo la liberación de éste y en consecuencia disminuyendo la liberación de dopamina y GABA lo que daría como resultado final la reducción de la actividad motora observada durante la administración de agonistas del receptor *D₃* en animales sanos. Por el contrario, el bloqueo de los receptores *D₃* subtálamo-nigrales, incrementaría la liberación de glutamato, promoviendo la liberación de dopamina, GABA y con ello actividad motora que se observa con el uso de antagonistas del receptor *D₃* en animales sanos. Experimentos adicionales son requeridos para demostrar lo anterior; resultados previos de microdiálisis asociados al comportamiento motor son compatibles con nuestra teoría (Rodríguez *et al.*, 2017).

Implicaciones en el Parkinson y la terapia con pramipexole.

En el estado sano, ambos receptores *D₁-like* y *D₃* se encuentran activos, en una probable interacción que daría como resultado la disminución de la actividad motora observada cuando se administran agonistas del receptor *D₃*. Sin embargo, como se mencionó en la introducción, en pacientes como en modelos con la enfermedad de Parkinson, los agonistas de los receptores *D₃* como el pramipexole favorecen el movimiento (Tayarani-Binazir *et al.*, 2010). En esta condición, debido a la falta de dopamina producida por la pérdida de neuronas de la SNc, se perdería la interacción entre glutamato-GABA-dopamina propuesta en el estado sano. En este caso, la liberación de glutamato no produciría la liberación de dopamina, lo que a su vez no permitiría incrementar la liberación de GABA por activación de los receptores *D₁-like* estriado-nigrales y únicamente se tendría la liberación de glutamato desde la entrada subtálmica en la SNr. Lo que trae consigo, la dificultad motora observada en la EP. Al administrar un agonista de los receptores *D₃*, se podrían activar los presentes en los tres lugares descritos previamente: los autorreceptores de las dendritas de la SNc, los estriado-nigrales y los subtálamo-nigrales. La activación de los autorreceptores *D₃* de las dendritas dopaminérgicas no tiene efecto sobre la liberación de dopamina, por la

ausencia de ésta en las neuronas de la SNc. Respecto a los receptores D₃ de las terminales estriatales, se ha reportado que la denervación produce un cambio en la vía de señalización de este receptor y ahora puede disminuir la liberación de GABA producida por la activación del receptor D₁; sin embargo, no es capaz de disminuir la liberación de este neurotransmisor con respecto al control (Avalos-Fuentes *et al.*, 2015). Por lo que es poco probable que este receptor participe en el efecto de los agonistas D₃. Finalmente, la participación del receptor D₃ subtálmico es altamente probable, ya que este receptor es capaz de señalizar por sí mismo (no requiere de la coactivación del receptor D₁ para tener efecto sobre la liberación, como ocurre con el receptor D₃ de las terminales estriado-nigrales) y disminuir la liberación de glutamato en la SNr, de hecho después de la denervación dopaminérgica se observó una potenciación del efecto inhibitorio. Al reducir la entrada glutamatérgica, disminuye la actividad de las neuronas nigrales de proyección, permitiendo la desinhibición de los núcleos premotores del tálamo y mejorando en última instancia la conducta motora en los pacientes y modelos con la enfermedad.

9. CONCLUSIONES

- Los receptores D_1 -like y D_3 contribuyen en mayor proporción al control de la liberación de glutamato en la SNr. Sin embargo, es activando al receptor D_3 que la dopamina tiene la mayor potencia.
- Los receptores D_2 y D_3 se oponen al incremento de la liberación producido por el receptor D_1 -like, y tienen un efecto aditivo entre sí.
- El receptor D_3 señala mediante la unión de subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G a canales de calcio dependientes de voltaje tipo N.
- La CaMKII α no modula la actividad del receptor D_3 sobre la liberación de glutamato en la terminal subtálamo-nigral.
- La denervación potencia el efecto del receptor D_3 en la liberación de glutamato en la SNr.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, J., B. Floran, et al. (1995). "D-1 receptor mediated modulation of the release of gamma-aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **19**(5): 727-739.
- Acosta-Garcia, J., N. Hernandez-Chan, et al. (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.
- Akunne, H. C., P. Towers, et al. (1995). "Characterization of binding of [3H]PD 128907, a selective dopamine D3 receptor agonist ligand, to CHO-K1 cells." Life Sci **57**(15): 1401-1410.
- Albin, R. L., A. B. Young, et al. (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." Trends Neurosci **12**(10): 366-375.
- 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.
- Arias-Montano, J. A., B. Floran, et al. (2007). "Dopamine D(1) receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels." Synapse **61**(5): 310-319.
- Audinot, V., A. Newman-Tancredi, et al. (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.
- Avalos-Fuentes, A., S. Albarran-Bravo, et al. (2015). "Dopaminergic denervation switches dopamine D3 receptor signaling and disrupts its Ca(2+) dependent modulation by CaMKII and calmodulin in striatonigral projections of the rat." Neurobiol Dis **74**: 336-346.
- Avalos-Fuentes, A., S. Loya-Lopez, et al. (2013). "Presynaptic CaMKIIalpha modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of

- the rat brain in a Ca²⁺(+) dependent manner." Neuropharmacology **71**: 273-281.
- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.
- Benazzouz, A., S. Breit, et al. (2002). "Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease." Mov Disord **17 Suppl 3**: S145-149.
- Bernardinelli, Y. and J. Y. Chatton (2008). "Differential effects of glutamate transporter inhibitors on the global electrophysiological response of astrocytes to neuronal stimulation." Brain Res **1240**: 47-53.
- Beurrier, C., P. Congar, et al. (1999). "Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode." J Neurosci **19**(2): 599-609.
- Bevan, M. D., J. P. Bolam, et al. (1994). "Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat." Eur J Neurosci **6**(3): 320-334.
- Boland, L. M., J. A. Morrill, et al. (1994). "omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons." J Neurosci **14**(8): 5011-5027.
- Bouthenet, M. L., E. Souil, et al. (1991). "Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA." Brain Res **564**(2): 203-219.
- Brown, J., W. X. Pan, et al. (2014). "The inhibitory microcircuit of the substantia nigra provides feedback gain control of the basal ganglia output." Elife **3**: e02397.
- Carbone, E., C. Calorio, et al. (2014). "T-type channel-mediated neurotransmitter release." Pflugers Arch **466**(4): 677-687.
- Cortes, H., F. Paz, et al. (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.
- Creese, I., D. R. Burt, et al. (1977). "Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity." Science **197**(4303): 596-598.
- Cruz-Trujillo, R., A. Avalos-Fuentes, et al. (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.
- Currie, K. P. (2010). "G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels." Channels (Austin) **4**(6): 497-509.
- Chetrit, J., A. Taupignon, et al. (2013). "Inhibiting subthalamic D5 receptor constitutive activity alleviates abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model of Parkinson's disease." J Neurosci **33**(37): 14840-14849.
- Chevalier, G. and J. M. Deniau (1990). "Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions." Trends Neurosci **13**(7): 277-280.
- Chipkin, R. E., R. D. McQuade, et al. (1987). "D1 and D2 dopamine binding site up-regulation and apomorphine-induced stereotypy." Pharmacol Biochem Behav **28**(4): 477-482.
- DePuy, S. D., J. Yao, et al. (2006). "The molecular basis for T-type Ca²⁺ channel inhibition by G protein beta2gamma2 subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14590-14595.
- Diaz, J., D. Levesque, et al. (1995). "Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain." Neuroscience **65**(3): 731-745.
- Diaz, J., C. Pilon, et al. (2000). "Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons." J Neurosci **20**(23): 8677-8684.
- Doudet, D. J., J. E. Holden, et al. (2000). "In vivo PET studies of the dopamine D2 receptors in rhesus monkeys with long-term MPTP-induced parkinsonism." Synapse **38**(2): 105-113.

- Elmhurst, J. L., Z. Xie, et al. (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.
- Fiorentini, C., C. Busi, et al. (2008). "Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization." Mol Pharmacol **74**(1): 59-69.
- Floran, B., L. Floran, et al. (2004). "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, et al. (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.
- Geffen, L. B., T. M. Jessell, et al. (1976). "Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra." Nature **260**(5548): 258-260.
- Gerfen, C. R. and D. J. Surmeier (2011). "Modulation of striatal projection systems by dopamine." Annu Rev Neurosci **34**: 441-466.
- Griffon, N., C. Pilon, et al. (1997). "Two intracellular signaling pathways for the dopamine D3 receptor: opposite and synergistic interactions with cyclic AMP." J Neurochem **68**(1): 1-9.
- Guillin, O., J. Diaz, et al. (2001). "BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization." Nature **411**(6833): 86-89.
- Guitart-Masip, M., B. Johansson, et al. (2008). "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 (Berl) **196**(1): 39-49.
- Guridi, J., M. T. Herrero, et al. (1996). "Subthalamotomy in parkinsonian monkeys. Behavioural and biochemical analysis." Brain **119** (Pt 5): 1717-1727.

- Hall, H., C. Halldin, et al. (1996). "Autoradiographic localisation of D3-dopamine receptors in the human brain using the selective D3-dopamine receptor agonist (+)-[3H]PD 128907." Psychopharmacology (Berl) **128**(3): 240-247.
- Heise, C. E. and J. Mitrofanis (2004). "Evidence for a glutamatergic projection from the zona incerta to the basal ganglia of rats." J Comp Neurol **468**(4): 482-495.
- Hernandez-Lopez, S., T. Tkatch, et al. (2000). "D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade." J Neurosci **20**(24): 8987-8995.
- Hernandez, A., O. Ibanez-Sandoval, et al. (2006). "Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors." J Neurophysiol **96**(6): 2877-2888.
- Hughes, A. J., Y. Ben-Shlomo, et al. (1992). "What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study." Neurology **42**(6): 1142-1146.
- Ibanez-Sandoval, O., A. Hernandez, et al. (2006). "Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors." J Neurophysiol **95**(3): 1800-1811.
- Kornhuber, J., J. S. Kim, et al. (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.
- Kulagowski, J. J., H. B. Broughton, et al. (1996). "3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1H-pyrrolo-2,3-b-pyridine: an antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor." J Med Chem **39**(10): 1941-1942.
- Langston, J. W. (2006). "The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg." Ann Neurol **59**(4): 591-596.
- Liu, X. Y., L. M. Mao, et al. (2009). "Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII." Neuron **61**(3): 425-438.

- Marcellino, D., S. Ferre, et al. (2008). "Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum." J Biol Chem **283**(38): 26016-26025.
- McCall, R. B., K. J. Lookingland, et al. (2005). "Sumanitrole, a highly dopamine D2-selective receptor agonist: in vitro and in vivo pharmacological characterization and efficacy in animal models of Parkinson's disease." J Pharmacol Exp Ther **314**(3): 1248-1256.
- Millan, M. J., A. Gobert, et al. (2000). "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 **293**(3): 1048-1062.
- Mintz, I., C. Hammond, et al. (1986). "Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra." Brain Res **376**(2): 406-408.
- Mitchell, P. R. and N. S. Doggett (1980). "Modulation of striatal [3H]-glutamic acid release by dopaminergic drugs." Life Sci **26**(24): 2073-2081.
- Murray, A. M., L. Harrinson, et al. (1995b). "A novel series of arylpiperazines with high affinity and selectivity for the dopamine D3 receptor." Bioorg Med Chem Lett **5**: 219-222.
- Naito, A. and H. Kita (1994). "The cortico-nigral projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine." Brain Res **637**(1-2): 317-322.
- Nava-Asbell, C., F. Paz-Bermudez, et al. (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.
- Neubig, R. R., M. Spedding, et al. (2003). "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology." Pharmacol Rev **55**(4): 597-606.

- Neumeyer, J. L., N. S. Kula, et al. (2003). "Receptor affinities of dopamine D1 receptor-selective novel phenylbenzazepines." Eur J Pharmacol **474**(2-3): 137-140.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, et al. (2008). "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, et al. (2000). "Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease." Trends Neurosci **23**(10 Suppl): S8-19.
- Ochiishi, T., T. Terashima, et al. (1994). "Specific distribution of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha and beta isoforms in some structures of the rat forebrain." Brain Res **659**(1-2): 179-193.
- Parent, A. and L. N. Hazrati (1995). "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.
- Poewe, W., K. Seppi, et al. (2017). "Parkinson disease." Nat Rev Dis Primers **3**: 17013.
- Prieto, G. A. (2017). "Abnormalities of Dopamine D3 Receptor Signaling in the Diseased Brain." J Cent Nerv Syst Dis **9**: 1179573517726335.
- Prieto, G. A., A. Perez-Burgos, et al. (2011). "Upregulation of D2-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D3 receptors acting on Ca V 2.1 channels via PIP2 depletion." J Neurophysiol **105**(5): 2260-2274.
- Pritchard, L. M., A. H. Newman, et al. (2007). "The dopamine D3 receptor antagonist NGB 2904 increases spontaneous and amphetamine-stimulated locomotion." Pharmacol Biochem Behav **86**(4): 718-726.
- Pugsley, T. A., M. D. Davis, et al. (1995). "Neurochemical and functional characterization of the preferentially selective dopamine D3 agonist PD 128907." J Pharmacol Exp Ther **275**(3): 1355-1366.

- Ramanathan, S., T. Tkatch, et al. (2008). "D2-like dopamine receptors modulate SKCa channel function in subthalamic nucleus neurons through inhibition of Cav2.2 channels." J Neurophysiol **99**(2): 442-459.
- Rangel-Barajas, C., I. Coronel, et al. (2015). "Dopamine Receptors and Neurodegeneration." Aging Dis **6**(5): 349-368.
- Recillas-Morales, S., L. Sanchez-Vega, et al. (2014). "L-type Ca(2)(+) channel activity determines modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra reticulata and the globus pallidus of the rat." Neuroscience **256**: 292-301.
- Reubi, J. C., L. L. Iversen, et al. (1977). "Dopamine selectively increases 3H-GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro." Nature **268**(5621): 652-654.
- Rivera, A., A. Penafiel, et al. (2008). "Cellular localization and distribution of dopamine D(4) receptors in the rat cerebral cortex and their relationship with the cortical dopaminergic and noradrenergic nerve terminal networks." Neuroscience **155**(3): 997-1010.
- Robertson, H. A. (1992). "Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease." Trends Neurosci **15**(6): 201-206.
- Robledo, P. and J. Feger (1990). "Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data." Brain Res **518**(1-2): 47-54.
- Rodriguez M, Loya S, et al. (2017), "D3 receptor blockade increased dopamine, glutamate and GABA levels in the substantia nigra reticulata and increases locomotor activity". Soc Neurosc Abstrc 592.14 / II5.
- Rosales, M. G., G. Flores, et al. (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.

- Rosales, M. G., D. Martinez-Fong, et al. (1997). "Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study." Neuroscience **80**(3): 803-810.
- Rubinstein, M., J. P. Muschietti, et al. (1990). "Adaptive mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treatment in mice." J Pharmacol Exp Ther **252**(2): 810-816.
- Schwartz, J. C., J. Diaz, et al. (1998). "Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence." Brain Res Brain Res Rev **26**(2-3): 236-242.
- Shen, K. Z. and S. W. Johnson (2006). "Subthalamic stimulation evokes complex EPSCs in the rat substantia nigra pars reticulata in vitro." J Physiol **573**(Pt 3): 697-709.
- 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**(10): 2273-2284.
- Sokoloff, P., J. Diaz, et al. (2006). "The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders." CNS Neurol Disord Drug Targets **5**(1): 25-43.
- Song, W. J., Y. Baba, et al. (2000). "Characterization of Ca(2+) channels in rat subthalamic nucleus neurons." J Neurophysiol **84**(5): 2630-2637.
- Squire, L. F, Bloom, et al. (2008). "Fundamental Neuroscience". Elsevier. Canada.
- Sun, W., K. Sugiyama, et al. (2010). "Different striatal D2-like receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion and medial forebrain bundle lesion in rats." Brain Res **1317**: 227-235.
- Surmeier, D. J., W. J. Song, et al. (1996). "Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons." J Neurosci **16**(20): 6579-6591.
- Svensson, K., A. Carlsson, et al. (1994). "Locomotor inhibition by the D3 ligand R-(+)-7-OH-DPAT is independent of changes in dopamine release." J Neural Transm Gen Sect **95**(1): 71-74.

- Takakusaki, K., T. Shiroyama, et al. (1996). "Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling." J Comp Neurol **371**(3): 345-361.
- Tayarani-Binazir, K. A., M. J. Jackson, et al. (2010). "Pramipexole combined with levodopa improves motor function but reduces dyskinesia in MPTP-treated common marmosets." Mov Disord **25**(3): 377-384.
- Thomas, K. L., S. Rose, et al. (1992). "Acute reserpine treatment induces down regulation of D-1 dopamine receptor associated adenylyl cyclase activity in rat striatum." Biochem Pharmacol **44**(1): 83-91.
- Vallone, D., R. Picetti, et al. (2000). "Structure and function of dopamine receptors." Neurosci Biobehav Rev **24**(1): 125-132.
- Waters, N., K. Svensson, et al. (1993). "The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity." J Neural Transm Gen Sect **94**(1): 11-19.
- Zhai, J. and R. C. Ma (1991). "[Nifedipine inhibits calcium-dependent potentials in guinea pig sympathetic neurons]." Sheng Li Xue Bao **43**(1): 73-77.
- Zhou, F. M. and C. R. Lee (2011). "Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons." Neuroscience **198**: 69-94.