



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“COEXISTENCIA DE LA SEÑALIZACIÓN TÍPICA Y ATÍPICA DEL D3R EN
NEURONAS ESTRIADO-NIGRALES DURANTE LA DENERVACIÓN
DOPAMINÉRGICA. CORRELACIÓN CON CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA
ISOFORMA D3NF”**

TESIS

Que presenta

M.C. BARUC CAMPOS CAMPOS

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de tesis: BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

Ciudad de México.

Marzo del 2020

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 4 Y 7 DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO Y GRACIAS AL DONATIVO OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) No. 152326.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este proyecto.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño por su dirección durante la realización del presente proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio 4 y 7, doctores, auxiliares, técnicos, alumnos y amigos.

DEDICATORIA

A mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Locomoción	6
1.2 Enfermedad de Parkinson	7
1.3 Terapéutica.....	8
2. GANGLIOS BASALES Y EL CONTROL MOTOR.....	10
2.1 Ganglios Basales.....	10
2.2 Organización Funcional de los Ganglios Basales.....	11
3. DOPAMINA	13
3.1 Síntesis de Dopamina.....	13
3.2 Receptores Dopaminérgicos	14
4. COEXPRESIÓN DE RECEPTORES D1 Y D3 EN NEURONAS DE LA VÍA DIRECTA.....	15
5. OLIGÓMEROS (HETERODÍMEROS DE GPCRs)	16
5.1 Heterodímero D1R-D3R.....	18
5.2 La coactivación del heterodímero D1R-D3R incrementa la potencia del D1R por la DA.....	19

5.3 Efecto potenciador del D3R sobre los efectos estimulatorios de la activación del D1R sobre la formación de AMPc, liberación de [³ H]-GABA y actividad locomotora	21
6. SEÑALIZACIÓN TÍPICA Y ATÍPICA DEL RECEPTOR D3.....	23
6.1 Denervación dopaminérgica cambia la señalización del receptor D3.....	24
6.2 Heterodímero D1R-D3R presente tras denervación dopaminérgica en Estriado y SNr	25
7. ISOFORMAS DEL RECEPTOR D3	28
7.1 Dominios estructurales involucrados en la función de los receptores	29
7.2 Splicing alternativo del receptor D3	30
7.3 Isoforma D3nf y su interacción física con el receptor D3	33
7.4 Modulación negativa de la isoforma D3nf sobre el receptor D3	35
8 JUSTIFICACIÓN.....	39
9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
10 HIPÓTESIS.....	39
11 OBJETIVO GENERAL	39
12 OBJETIVOS PARTICULARES	40
13 MATERIAL Y MÉTODOS	41

13.1 Animales	41
13.2 Lesión con 6-OHDA	41
13.3 Obtención de las rebanadas de cerebro	42
13.4 Preparación de Sinaptosomas	42
13.5 Determinaciones de RTq-PCR.....	43
13.6 Western Blot	44
13.7 Binding del receptor D3.....	44
13.8 Ensayo de Proximidad de Ligando (PLA)	45
13.9 Microscopia Láser Confocal	46
13.10 Acumulación de [³ H]-AMPC.....	47
13.11 Liberación de [³ H]-GABA	47
13.12 Experimentos Conductuales.....	48
13.13 Análisis Estadístico.....	50
13.14 Fármacos	50
14. RESULTADOS	51
14.1 La denervación con 6-OHDA disminuye los niveles de expresión de RNAm y proteína de la isoforma D3nf sin cambios de expresión en el receptor D3	51
14.2 La denervación incrementa la densidad de receptores D3 en la membrana	55
14.3 La denervación dopaminérgica no modifica la interacción D1R-D3R, pero disminuye la dimerización D3R-D3nf	56
14.4 El bloqueo de la señalización de proteínas Gi desenmascara la coexistencia de la señalización típica y atípica del D3R sobre la formación de AMPC	58

14.5 Efecto del NEM sobre la activación del D3R en liberación de [³ H]-GABA durante la denervación.....	63
14.6 La señalización típica y atípica participan en los efectos motores de la coactivación de los receptores D1 y D3.....	67
15. DISCUSIÓN	71
15.1 Cambios en la expresión relativa del D3R y su isoforma D3nf durante condiciones control y condiciones de denervación dopaminérgica	71
15.2 Coexistencia de la señalización “típica” y “atípica” del D3R durante la denervación dopaminérgica.....	76
15.3 Repercusión de la señalización típica y atípica del D3R sobre la conducta motora	80
16. CONCLUSIÓN	83
17. CONTRIBUCIONES.....	83
18. BIBLIOGRAFÍA.....	85

RESUMEN

Desde su descubrimiento en 1990 los receptores dopaminérgicos D3 han sido relacionados con una serie de enfermedades neurodegenerativas y ciertos padecimientos neuropsiquiátricos como la enfermedad de Parkinson, Huntington, abuso de drogas, esquizofrenia entre otros.

Durante la caracterización del receptor D3 en los ganglios basales su expresión y localización parecía estar regionalizada a la vía indirecta. Sin embargo, diversos investigadores evidenciaron también una localización en la vía directa, coexistiendo e interaccionando físicamente con el receptor D1 (heterodímero D1R-D3R) en las terminales estriado-nigrales positivas a sustancia P. En condiciones fisiológicas el receptor D3 presenta una vía de señalización “atípica” ya que a pesar de estar acoplado a proteínas Gi, al ser coactivado con el receptor D1 ejerce un efecto potenciador sobre los efectos estimulatorios de la activación del receptor D1 sobre la formación de AMPc, liberación de [³H]-GABA y actividad locomotora. Interesantemente, en condiciones de denervación dopaminérgica la señalización del receptor D3 cambia a una señalización “típica” ya que al ser coactivado con el receptor D1, el receptor D3 ejerce su inhibición característica sobre los parámetros mencionados.

Por otro lado, se ha establecido que la isoforma no funcional del receptor D3, el D3nf es sensible a cambios en el tono dopaminérgico, en tonos dopaminérgicos elevados incrementa su expresión y en tonos dopaminérgicos bajos su expresión disminuye. A su vez, la isoforma D3nf es capaz de interaccionar físicamente con el receptor D3 y modular negativamente su expresión/localización en la membrana plasmática.

En este estudio utilizamos ratas hemiparkinsonianas, denervadas con 6-OHDA en el haz del cerebro medio, por medio de estudios de RTq-PCR evidenciamos que en el estriado del hemisferio lesionado hay una disminución del RNAm de la isoforma D3nf sin alteraciones en la expresión del receptor D3, lo anterior es conservado a nivel proteico por medio experimentos de Western Blot en estriado y en sustancia Nigra Reticulata y a su vez se correlaciona con un incremento en la unión máxima (binding) del radio ligando del receptor D3, [³H]-7-OH-DPAT en membranas estriatales del hemisferio lesionado.

Por otro lado, evidenciamos la señalización “atípica” y “típica” del receptor D3 sobre la formación de AMPc, liberación de [³H]-GABA y actividad locomotora en condiciones fisiológicas y en denervación dopaminérgica respectivamente. Interesantemente, desenmascaramos la señalización “atípica” del receptor D3 (efecto sinérgico), en denervación dopaminérgica por medio del uso de N-etilmaleimida, agente alquilante de las proteínas Gi en los parámetros antes mencionados, así como a nivel conductual evaluando la conducta de giro.

Gracias a todas las evidencias experimentales obtenidas, proponemos que en condiciones de denervación dopaminérgica la isoforma D3nf disminuye su expresión y por lo tanto los receptores D3 que mantenía en compartimentos intracelulares pueden translocarse a la membrana plasmática y ejercer su efecto inhibitorio clásico sobre la activación de los receptores D1 o el heterodímero D1R-D3R, Dicho mecanismo molecular de modulación es sumamente importante ya que es muy probable que éste presente en las etapas iniciales de la enfermedad de Parkinson así como en condiciones en las que el tono dopaminérgico sea alterado y el receptor D3 esté involucrado.

ABSTRACT

Since its discovery in 1990, D3 dopamine receptors have been related to a series of neurodegenerative diseases and certain neuropsychiatric conditions such as Parkinson's disease, Huntington, Drug abuse, Schizophrenia, among others.

During the characterization of the D3 receptor in the basal ganglia its expression and location seemed to be regionalized to the indirect pathway, however, several researchers also showed a direct pathway location, coexisting and physically interacting with the D1 receptor (D1R-D3R heterodimer) in the striato-nigral terminals positive to substance P.

Under physiological conditions, the D3 receptor has an "atypical" signaling pathway, despite being coupled to Gi proteins, being coactivated with the D1 receptor exerts an potentiating effect on the stimulatory effects of D1 receptor activation on cAMP accumulation, [³H]- GABA release and locomotion. Interestingly, under conditions of dopaminergic denervation the signaling of the D3 receptor changes to a "typical" signaling since being coactivated with the D1 receptor, the D3 receptor exerts its characteristic inhibition on the mentioned parameters.

On the other hand, it has been established that the non-functional isoform of the D3 receptor, the D3nf is sensitive to changes in the dopaminergic tone, in high dopaminergic tones increases its expression and in low dopaminergic tones its expression decreases, in turn, the D3nf isoform It is capable of physically interacting with the D3 receptor and negatively modulating its expression / location in the plasma membrane.

We used hemiparkinsonian rats, denervated with 6-OHDA in the middle forebrain bundle, through RTq-PCR studies we show that in the Striatum of the lesioned hemisphere there is a decrease in the D3nf isoform mRNA without alterations in D3 receptor expression, the above is preserved at the protein level by means of Western Blot experiments in Striatum and in Substantia Nigra reticulata and in turn correlates with an increase in the maximum binding of the radioactive ligand of the D3 receptor, [³H] -7-OH- DPAT in striatal membranes of the lesioned hemisphere.

On the other hand, we demonstrated the "atypical" and "typical" signaling of the D3 receptor on cAMP formation, [³H]-GABA release and locomotor activity under physiological conditions and dopaminergic denervation respectively. Interestingly, we unmask the "atypical" signaling of the D3 receptor (synergistic effect) in dopaminergic denervation using N-ethylmaleimide, alkylating agent of the Gi proteins in the aforementioned parameters and also at the behavioral level evaluating turning behavior.

Thanks to all the experimental evidence obtained, we propose that under conditions of dopaminergic denervation the D3nf isoform decreases its expression and therefore the D3 receptors that it held in intracellular compartments can translocate to the plasma membrane and exert its classic inhibitory effect on the activation of the D1 receptors or the D1R-D3R heterodimer, such molecular modulation mechanism is extremely important since it is very likely to be present in the initial stages of Parkinson's disease as well as in conditions where the dopaminergic tone is altered and the D3 receptor is involved.

ABREVIATURAS

aCSF	Fluido artificial cerebroespinal
ADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AKT	Proteína quinasa B serina/treonina quinasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
[³ H]-AMPc	Adenosín monofosfato cíclico tritiado
ATP	Adenosín trifosfato
B _{max}	Unión máxima
BRET	Estudio de transferencia de energía bioluminiscente
CaMKII	Cinasa dependiente de calcio calmodulina II
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
cm	Centímetros
COMT	Catecol –O – metiltransferasa
DA	Dopamina
DHA	Ácido docosahexaenoico
D1R	Receptor dopaminérgico D1
D2R	Receptor dopaminérgico D2
D3R	Receptor dopaminérgico D3
D4R	Receptor dopaminérgico D4
D5R	Receptor dopaminérgico D5
D3nf	Isoforma trunca del D3R no funcional
EEDQ	Antagonista irreversible de los 5 receptores dopaminérgicos
EGTA	Ácido Tetraacético de Etilenglicol
EP	Enfermedad de Parkinson
fmol	Femtamol
GABA	Ácido γ aminobutírico
[³ H]-GABA	Ácido γ aminobutírico tritiado
GB	Ganglios Basales
GHS-R1a	Receptor a Grelina
GHS-R1b	Isoforma trunca del receptor a Grelina

GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPe	Globo Pálido Externo
GPi	Globo Pálido Interno
HEK 293	Células de riñón embrionario humano 293
HEPES	Buffer de ácido sulfónico zwitteriónico
Hprt 1	Gen de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
HRP	Peroxidasa de rábano
i.p.	Intraperitoneal
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica
K-H	Krebs Henseleit
KDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
K.O.	knockout
L-DOPA	Levodopa, L-3,4 dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino oxidasa
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
mg	Miligramos
mIPSCs	Corrientes inhibitorias postsinápticas miniatura
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridona
NEM	Inhibidor de la señalización de las proteínas Gi
NEMs	Neuronas Espinosas Medianas
nM	Nanomolar
ns	No significativo
NST	Núcleo subtalámico
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína cinasa A
PLA	Ensayo de Proximidad de Ligando

PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RTq-PCR tiempo real	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real
SDS-PAGE sodio.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SNC	Sustancia Nigra Compacta
SNr	Sustancia Nigra Reticulada
SPNs	Neuronas Espinosas de Proyección
TH	Tirosina Hidroxilasa
Vs.	Versus
6-OHDA	6-hidroxidopamina
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Grados Centígrados

1 INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento en 1990 los receptores dopaminérgicos D3 han sido relacionados con la generación y el mantenimiento de una serie de enfermedades neurodegenerativas y ciertos padecimientos neuropsiquiátricos como la enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington, el abuso de drogas, el Temblor esencial, la esquizofrenia, entre otras (Sokoloff P. et al., 1990 y 2017, Schmauss C. 1993 y 1996 y Prieto GA. 2017). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales el receptor D3 ejerce su compleja serie de efectos a nivel fisiológico y/o patológico no han sido del todo identificados y su comprensión es abrumadoramente compleja.

Lo anterior se debe a diversos factores, entre los cuales destacan; a). - La regionalización del receptor D3 en diversas estructuras cerebrales, que, a su vez, forman parte de circuitos neuronales especializados responsables de la generación y/o modulación de funciones altamente específicas (Prieto GA. et al., 2011, Sales MJ. et al., 2013, Chen G. et al., 2006, Swant J. et al., 2008 y Araki KY. et al., 2007), b). - Un amplio rango de acople a proteínas G y por lo tanto una amplia variedad de múltiples efectores (Pedrosa R. et al., 2004, Zaworski PG. Et al., 1999, Chio CL. Et al., 1994, Kuzhikandathil EV. et al., 1999, Cussac D. et al., 1999 e Ilani T. et al., 2002.), c). - Capacidad del receptor D3 de formar heterodímeros funcionales, y por lo tanto, cambiar su señalización típica a atípica (Torvinen M. et al., 2005, Marcelino D. et al., 2008, Fiorentini C. et al., 2008, Scarselli M. et al., 2001 y Bontempi L. et al., 2017) y d). - La señalización y/o función de dichos heterodímeros puede por su parte también ser modificada, tanto cualitativa como cuantitativamente en ciertos estados patológicos, como en la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia (Prieto GA. 2017).

1.1 Locomoción

La locomoción es un proceso imprescindible para la vida y la evolución de las especies, desde organismos unicelulares hasta especímenes complejos la capacidad de movimiento es esencial para la supervivencia, de ahí la importancia de estudiar las patologías relacionadas a alteraciones en la capacidad y control del movimiento.

Se sabe que la generación y control del movimiento voluntario en mamíferos está dado por una serie de estructuras subcorticales denominadas en su conjunto como Ganglios Basales (GB), los cuales se consideran una red neuronal altamente organizada y especializada donde hay una activación diferencial de sus componentes para distintas funciones y circunstancias. Los núcleos que conforman los GB son la corteza, el estriado, el globo pálido en su porción externa e interna (GPe y GPi), el núcleo subtalámico (NST), la sustancia nigra pars compacta y reticulata (SNc y SNr) y el tálamo. El circuito que conforman los ganglios basales es modulado por la dopamina proveniente de la SNc la cual inerva y libera dopamina sobre los núcleos que conforman los GB (Obeso J.A. et al., 2008).

1.2 Enfermedad de Parkinson

Dentro de las patologías que afectan importantemente la locomoción se encuentra la enfermedad de Parkinson (EP) la cual es un desorden neurodegenerativo, progresivo y heterogéneo que típicamente afecta a adultos mayores, y que es causado por la degeneración de las neuronas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNc) presentes en los GB, se predice que para el año 2030 probablemente alrededor del 3% de la población mundial cerca de los 65 años de edad se verán afectada por esta enfermedad (Palakurthi B. et al., 2019).

Los síntomas de la EP son principalmente motores; temblores, rigidez, bradicinesia, inestabilidad postural, hipomimia, micrografía, festinación, marcha arrastrada, disartria y distonía. Los síntomas no motores incluyen disfunción autonómica, anormalidades cognitivas, demencia, desordenes del sueño, anosmia y dolor (Aarsland D. et al., 2017, Jankovic J. 2008 y Obeso J. A. et al., 2017).

En cuanto a su epidemiología la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer con una incidencia anual de 15 por cada 100,000 habitantes, su prevalencia en la población general es de 0.3% (Kowal S.L. et al., 2013) y en personas mayores de 65 años es un 1% (Tysnes O. B. et al., 2017).

Con lo que respecta a su etiología, se cree que la EP es una condición multi etiológica con una interacción entre factores ambientales y genéticos en un individuo susceptible. Entre los factores ambientales que se sabe influyen en el desarrollo de la EP destacan vivir en zonas rurales, exposición a pesticidas, consumo de café, cigarrillos y alcohol (Obeso J.A. et al., 2017 y Mayeux R. 2003). Por otro lado, entre los factores genéticos destacan mutaciones en el gen SNCA que causa agregación de la proteína α -sinucleína (Polymeropoulos M.H. et al., 1997), el gen PRKN que altera la degradación proteica proteosomal (Kitada T. et al., 1998) disminuyendo la respuesta al estrés oxidativo por mutaciones en la proteína DJ1 (Bonifati V. et al., 2003), déficit cognitivo debido a mutaciones en COMT Val/Val (Sampedro F. et al., 2019) y mutaciones en la Cinasa 2 repetida rica en leucina (LRRP2) en el locus PARK8 (Bekris L.M. et al., 2010, Haugarvoll K. et al., 2009 y Zimprich A. et al., 2004).

Por otro lado, la EP también se ve afectada por el estado nutricional del individuo, se han reportado efectos benéficos neuroprotectores por algunos agentes alimenticios como el ácido docosahexaenoico (DHA) y la vitamina A. (Seidl S.E. et al., 2014, Garcion E. et al., 2002 y Horrocks L.A. et al., 1999). Mientras que su deficiencia puede perjudicar el balance y la progresión de la EP (Newman R.P. et al., 1985, Evatt M.L. et al., 2013 y Sato Y. et al., 1997).

1.3 Terapéutica

En 1817 el doctor James Parkinson publicó su ensayo “An Essay on the Shaking Palsy” (Parkinson J. 1817) en el que, a pesar de las limitaciones de su época, describe a detalle la enfermedad neurodegenerativa que lleva su apellido.

Sorprendentemente, tuvieron que transcurrir 150 años después de dicha publicación para que en 1967 George C. Cotzias y sus colaboradores publicaran el artículo seminal que lanzo la era de la levodopa; fármaco de primera elección para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Cotzias GC. et al., 1967).

Los beneficios iniciales de la terapia con levodopa fueron comprobados 2 años más tarde por Yahr y colaboradores (Yahr et al., 1969) en un ensayo clínico doble ciego y placebo controlado con levodopa en 60 pacientes con Parkinsonismo, de los cuales 81% alcanzó un “mejoramiento general significativo”.

Es también remarcable que, a la fecha (2020), han transcurrido 53 años desde el descubrimiento de la levodopa y aunque han sido introducidos nuevos fármacos con actividad antiparkinsoniana al mercado, la levodopa sigue siendo el tratamiento más efectivo sobre los síntomas motores de la EP. Sin embargo, el uso de la levodopa trae consigo el desarrollo de efectos secundarios agudos y crónicos entre los que se encuentran: náuseas, somnolencia y aturdimiento ortostático. Con el tratamiento crónico de levodopa los efectos secundarios son más importantes e incluso incapacitantes como: fluctuaciones motoras y discinesias, alucinaciones y otros efectos secundarios psiquiátricos. Con un mejor entendimiento de los efectos clínicos y farmacológicos la respuesta a levodopa puede ser optimizada ajustando hábilmente su dosificación y adaptándola a las necesidades individuales de los pacientes. Además, nuevas formulaciones de levodopa están siendo desarrolladas para mejorar la respuesta al tratamiento (Lotia M et al., 2016 y Freitas ME et al., 2016).

A pesar de ser el medicamento de primera elección y el más efectivo para tratar los síntomas motores de la EP y estar en uso por más de medio siglo, su mecanismo de acción exacto en la EP es desconocido. Por todo lo anterior y tras transcurrir 203 años desde el descubrimiento de esta enfermedad neurodegenerativa, y a pesar del desarrollo científico-tecnológico que se tiene hasta la fecha, resulta completamente sorprendente que aún no se desarrolle una cura definitiva para la EP o incluso se establezca su etiología exacta.

2. GANGLIOS BASALES Y CONTROL MOTOR

2.1 Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son una serie de estructuras subcorticales que forman una red altamente organizada en donde existe una activación diferencial a distintos niveles dependiendo de funciones y circunstancias específicas. Dentro de la clasificación funcional de los ganglios basales se encuentran: El estriado (caudado-putamen), el globo pálido en su región externa (GPe) e interna (GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra en su porción compacta (SNc) y reticulada (SNr). El sistema dopaminérgico proveniente de la SNc que a su vez inerva todas las estructuras que conforman los GB (Obeso, et al., 2008).

Estriado (caudado-putamen): Es considerado el núcleo pivote y principal punto de entrada de información cortical hacia los GB, consiste aproximadamente en más del 90% de neuronas espinosas medianas (NEMs) que utilizan GABA como neurotransmisor (Perreault, et al., 2011). Aproximadamente el 5% de neuronas estriatales remanentes consiste en interneuronas no espinosas que expresan acetilcolina, somatostatina, GABA asociado a parvalbúmina o calretina (Gerfen & Surmeier 2011).

Globo Pálido Interno: Al contrario del estriado, el GPi junto con la SNr se consideran los núcleos de salida de la información de los GB de vuelta hacia la corteza, proyecta principalmente al tálamo motor, sus aferentes son de tipo GABAérgicas y glutamatérgicas y su balance determina la funcionalidad del núcleo.

Globo Pálido Externo: Sus neuronas son de naturaleza GABAérgica y a su vez proyecta hacia el NST y la SNr (Rommelfanger & Wichmann., 2010). Sus aferentes son provenientes del estriado (GABAérgicas) y del núcleo subtalámico (Glutamatérgicas).

Sustancia Nigra pars Compacta: Sus neuronas son de naturaleza dopaminérgica, proyectan al estriado, al GPe y al NST, estas neuronas son las encargadas de la inervación dopaminérgica de hacia las distintas estructuras de los GB.

Sustancia Nigra pars Reticulata: Sus neuronas son de naturaleza GABAérgica, presenta actividad espontánea, y proyecta al tálamo, colículo superior y núcleo pedunculopontino. Presenta aferentes glutamatérgicas del núcleo subtalámico, aferentes GABAérgicas provenientes del estriado y del GPe y aferentes dopaminérgicas provenientes de la SNc (Smith & Villalba., 2008).

Núcleo Subtalámico: Es de naturaleza glutamatérgica y presenta actividad autónoma, recibe inervación GABAérgica del GPe, glutamatérgica de la corteza sensorimotora y dopaminérgica de la SNc, a su vez envía proyecciones hacia la SNr, estriado, núcleo entopeduncular, SNc y corteza motora (Fig. 1).

2.2 Organización funcional de los Ganglios Basales

Actualmente los GB están funcionalmente subdivididos en regiones dependiendo de la principal área de proyección cortical, en región motora, oculomotora, región asociativa, límbica y orbitofrontal (Alexander G. E., et al., 1986; Smith Y, et al., 1998).

Esta organización mantiene funciones como la atención, aprendizaje, conductas de recompensa, formación de hábitos, memoria de trabajo, emociones entre otros y dependen a su vez de la región cortical activada. (Pasupathy A, et al., 2005; Hikosaka O, et al., 2002; Seger CA, 2006). Esta compleja organización anatómico-funcional cambió la manera tradicional de ver a los GB como centros de procesamiento motor, sin embargo, el papel de los GB en los desórdenes del movimiento es el mejor definido y entendido.

Clásicamente el circuito de los GB está dividido en dos vías, una directa y una indirecta. Vía directa: Corteza-Estriado-SNr-Tálamo. Por otro lado, la vía indirecta: Corteza-Estriado-GPe-STN-SNr-Tálamo. (Obeso J.A. et al., 2008).

La modulación ejercida por la dopamina es llevada a cabo por el sistema dopaminérgico, se ha evidenciado una expresión diferencial de receptores D1 en neuronas espinosas medianas de proyección (SPNs) del estriado que coexpresan Sustancia P y Dinorfina que conforman la vía directa, por otro lado, se ha reportado una expresión diferencial de receptores D2 en SPNs que expresan encefalina y que conforman la vía indirecta (Diaz 1995, Surmeier 1996 y 2011).

La activación de ambas vías (D1Rs y D2Rs) a través de la Dopamina proveniente de las neuronas de la SNc promueven la generación de movimiento voluntario (Fig. 1).

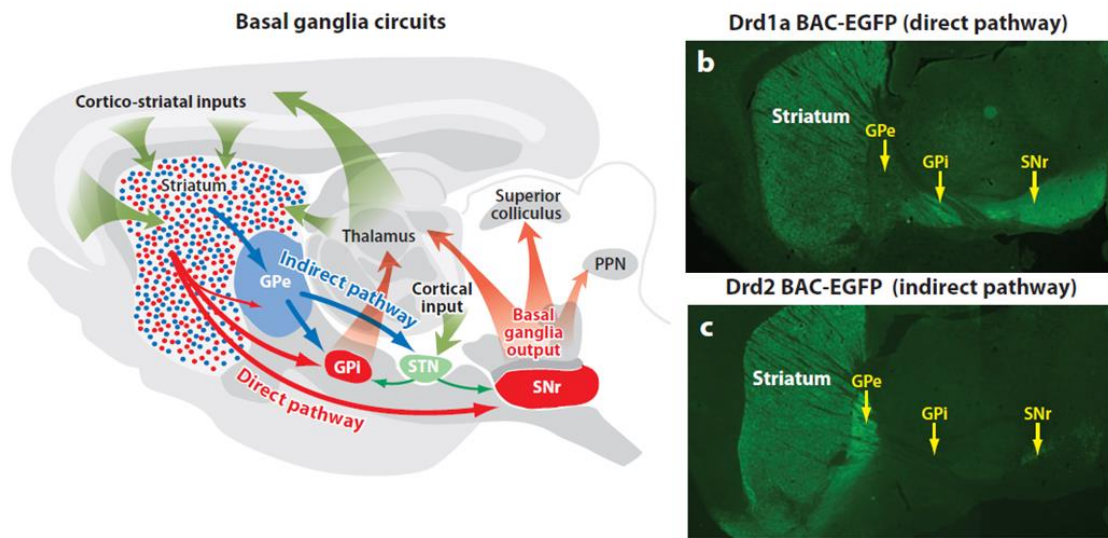


Figura 1. Organización funcional de los Ganglios Basales. Modificada de Surmeier D.J. et al., 2011. Izquierda, esquema de la organización funcional de los ganglios basales ilustrando las vías directa e indirecta. Derecha, b) expresión preferencial del D1R en la vía directa y c) expresión preferencial del D2R en la vía indirecta, ambos son cortes sagitales de ratones transgénicos Drd1a BAC-EGFP para la vía directa y Drd2a BAC-EGFP para la vía indirecta respectivamente.

Todas las neuronas del GPe, GPI, STN, y SNr son marcapasos autónomos, es decir generan potenciales de acción por su cuenta sin necesidad de establecer entradas sinápticas (Gerfen & Surmeier., 2011) en este mecanismo la dopamina tiene un papel imprescindible al modular los efectos de las entradas corticales glutamatérgicas por ejercer un efecto dual sobre las neuronas estriatales GABAérgicas excitando a las neuronas de la vía directa e inhibiendo a las neuronas de la vía indirecta modulando a las neuronas de los núcleos de salida (GPI/SNr) que proyectan hacia el tálamo y de esta manera controlar la generación de movimiento.

3. DOPAMINA

La dopamina (DA) es la catecolamina con función neurotransmisora predominante en el cerebro de los mamíferos donde controla una variedad de funciones entre las cuales se encuentra la actividad locomotora, la cognición, las emociones, el reforzamiento, la ingesta de comida y la regulación endocrina. En la periferia la DA participa como modulador de la función cardiovascular, liberación de catecolaminas, secreción de hormonas, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale C., et al., 1998).

3.1 Síntesis de Dopamina

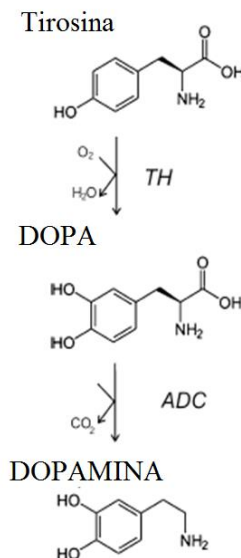


Figura 2. Síntesis de dopamina. Modificada de Rondou P. et al., 2010.

La dopamina es una catecolamina formada por un grupo catecol; benceno con dos hidroxilos (Fig. 2) y una cadena de etilamina (Jackson, et al., 1994). Su síntesis se lleva a cabo en el citosol de terminales nerviosas donde se encuentran en elevada concentración las enzimas responsables; la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (ADC), una vez sintetizada la dopamina es transportada a vesículas para su almacenamiento a través de una bomba de protones dependiente de ATP, y puede ser degradada tanto en el citosol como en la terminal postsináptica por la monoamino oxidasa (MAO) y la Catecol – O- metiltransferasa (COMT), (Felman, et al., 1997).

Una vez liberada la dopamina al espacio sináptico se une a sus distintos receptores tanto pre como postsinápticos y el factor que determina el fin de su efecto esta dado por su recaptura y/o degradación enzimática en las propias terminales que la liberaron. (Cooper, et al., 1996).

3.2 Receptores Dopaminérgicos

Las acciones fisiológicas de la dopamina están mediadas por al menos 5 diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G (Fig.3), clasificados en familia D1-like (D1 y D5) y D2-like (D2, D3 y D4) Spano et al. (1978). Al principio fueron clasificados con base en su actividad estimuladora o inhibitoria sobre la enzima adenilato ciclasa (Kebabian & Calne, 1979), posteriormente se diferenciaron claramente gracias a estudios farmacológicos, bioquímicos, fisiológicos y genéticos, así como a su distribución anatómica.

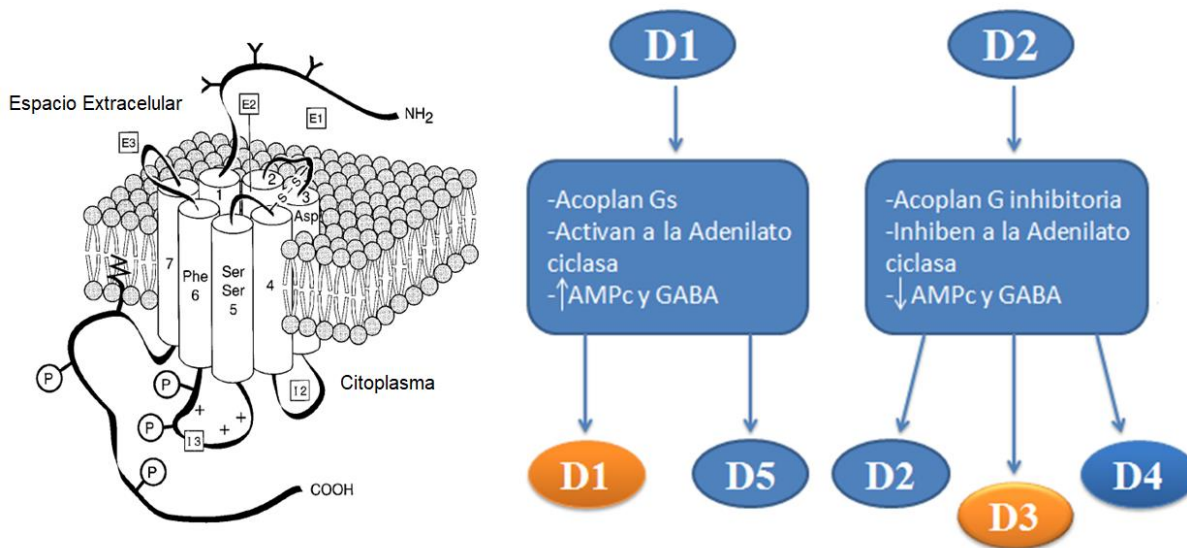


Figura 3 Estructura molecular y clasificación de los receptores dopaminérgicos. Modificada de Missale C. et al., 1998. Izquierda, esquema representativo de la estructura molecular de los receptores dopaminérgicos. Derecha, clasificación de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y tipo D2. En amarillo se ilustran los receptores dopaminérgicos que a pesar de formar parte de familias distintas interactúan físicamente formando un heterodímero D1R-D3R funcional, crucial para el presente proyecto de investigación.

4. CO-EXPRESIÓN DE RECEPTORES D1 Y D3 EN NEURONAS DE LA VÍA DIRECTA

Lo anterior en su conjunto, es considerado el modelo clásico de organización funcional de los ganglios basales, sin embargo, en los últimos años ha surgido evidencia suficiente para cambiar la percepción de dicho modelo (Fig. 4), como la mostrada por Diaz en 1995 (Diaz J. et al., 1995) donde por medio estudios de hibridación *in situ* demuestra la ausencia del RNAm de D3R en neuronas de la SNr.

Por otro lado, Surmeier en 1996 (Surmeier D.J. et al., 1996) por medio de estudios de PCR en célula única evidencian el RNAm del D3R en neuronas estriatales positivas para encefalina y sustancia P, es decir, coexpresión de receptores Tipo D2 tanto en la vía directa como en la vía indirecta. Interesantemente, Diaz en el 2000 (Diaz et al., 2000) por medio de estudios de inmunohistoquímica evidencio la presencia de la proteína del D3R en neuronas de la SNr, debido a que en la SNr no se ha encontrado el RNAm para el D3R (arriba) es probable que los D3R presentes en la SNr provengan de distintos núcleos que proyectan sus terminales hacia la SNr por medio de transporte anterógrado, entre dichos núcleos se encuentra el estriado dorsal y el ventral (Núcleo Accumbens) así como en núcleo subtalámico.

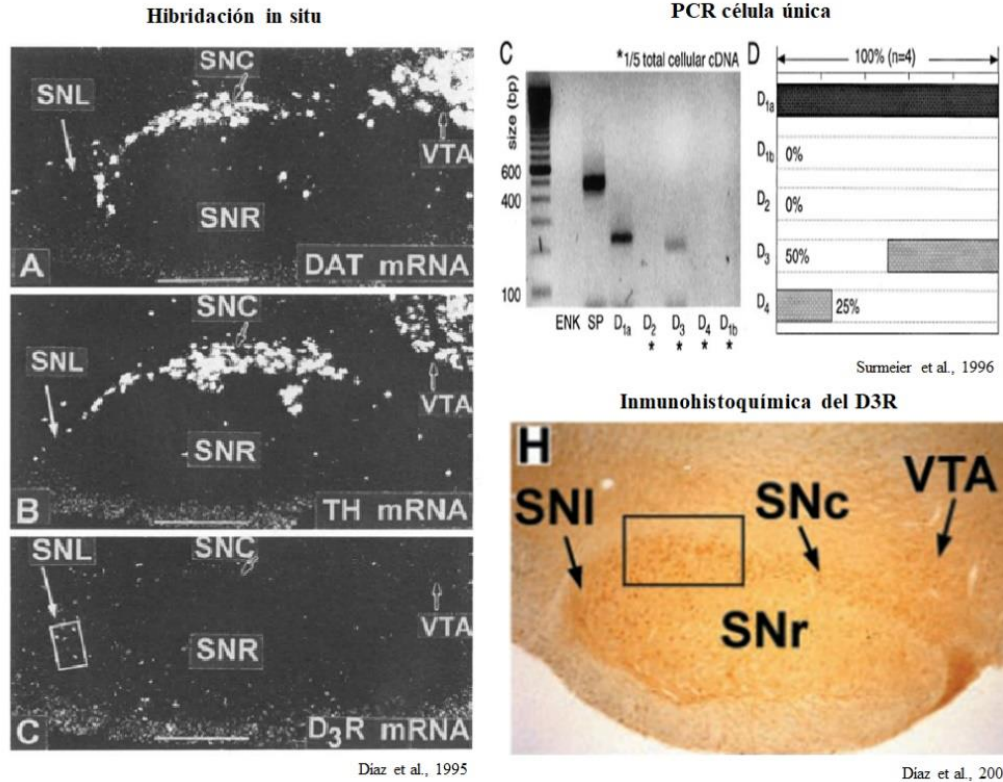


Fig. 4. Evidencia de coexpresión de receptores D1 y D3 en neuronas estriato-nigrales de la vía directa. Modificada de Diaz et al., 1995; Surmeier et al., 1996 y Diaz et al., 2000. Izquierda C, se evidencia la ausencia de la expresión del RNAm del D3R a nivel de la SNr por medio de estudios de Hibridación in situ. Superior derecha, coexpresión de los receptores D1 y D3 en la misma célula por medio de estudios PCR en célula única. Inferior derecha, expresión proteica del D3R a nivel de la SNr por medio de estudios de Immunohistoquímica.

5. OLIGÓMEROS (HETERODÍMEROS DE GPCRs)

Hoy en día existe gran cantidad de evidencia que muestra que la unidad básica funcional de los receptores acoplados a proteínas G de 7 dominios transmembranales (GPCRs) es un dímero, con la posibilidad de que existan especies oligoméricas de orden superior (Kong et al., 2005). La oligomerización en GPCRs ha demostrado ser un proceso fisiológico que define la función y la farmacología del receptor (George SR. et al., 2002; Bouvier M. 2001), es decir, presentan complejas y dinámicas conexiones fisicoquímicas para llevar a cabo diversas funciones biológicas (Casadó-Anguera V. et al., 2019).

La estructura de todos los GPCRs tiene en común la existencia de un dominio extracelular para el reconocimiento del estímulo y un dominio intracelular para la propagación de la señal a transductores como las proteínas G (Schmitz J. et al., 2014). Dichos GPCRs están involucrados en 80% o más procesos de transducción de señales que ocurren en las membranas celulares ejerciendo su efecto por su asociación a proteínas G heterotriméricas en respuesta a una vasta gama de ligandos extracelulares incluyendo fotones, neurotransmisores, hormonas y péptidos (Wells GJ. et al., 2014).

Los GPCRs son las proteínas de membrana más importantes en medicina clínica ya que actualmente aproximadamente el 40% de todos los fármacos en el mercado están dirigidos a dichos receptores (Katrish V. et al., 2013; Wang C-IA et al., 2013). La idea de que los GPCRs solo funcionaban como entidades monoméricas era generalmente aceptada (Whorton MR et al., 2007 y 2008; Chabre M et al., 2009; Kuszak AJ et al., 2009 y Thomsen ARB et al., 2016). Sin embargo, durante las últimas 2 décadas, numerosos GPCRs de diferentes clases han sido reportados como homodímeros, heterodímeros y oligómeros de orden superior, y son comúnmente esenciales para la función del GPCR (Farran B 2017; Ferré S. et al., 2014 y Gomes I et al., 2016). Además, se ha sugerido que generalmente, las estructuras oligoméricas de GPCRs son necesarias para la maduración, activación, regulación y transducción de señal del receptor (Lopez-Gimenez JF et al., 2007; Milligan G. 2013; Rivero-Müller A et al., 2013 y Ulloa-Aguirre A et al., 2014).

Un oligómero de un receptor se ha definido como un complejo macromolecular compuesto por al menos 2 iguales (homómeros) o diferentes (heterómeros) unidades funcionales del receptor (protómeros) con propiedades bioquímicas y funcionales que son claramente diferentes de sus componentes individuales debido a las modulaciones alostéricas que ocurren en el oligómero (Ferré S. et al., 2014), esto es llamado la huella bioquímica del oligómero (Ferré S. et al., 2009).

En este sentido la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR) (Ferré S. et al., 2009; Gomes I et al., 2016; Kenakin T et al., 2010 y Pin-JP et al., 2007) estableció 3 criterios de consenso para definir heterómeros GPCRs, el primero es que los heterómeros tienen que exhibir propiedades específicas que deben ser diferentes de sus protómeros individuales, como tráfico, unión a ligando y señalización. El segundo es que los componentes del heterómero no solo tienen que co-localizar en el mismo compartimento subcelular, sino que también tienen que interactuar físicamente en tejidos nativos. El tercero es que la disrupción del heterómero debe provocar una pérdida de la interacción y como consecuencia la pérdida de su particular huella bioquímica.

Esta huella farmacológica y/o funcional es consecuencia de las interacciones alostéricas dentro de las proteínas del heterómero. Además, un heterómero no es exclusivo de GPCRs, sino que también pueden ser interacciones con diferentes no-GPCRs como canales (Casado-Anguera V. et al., 2019).

5.1 Heterodímero D1R-D3R

Uno de los heterodímeros más aceptados, caracterizados y controversiales actualmente es el D1R-D3R. Fiorentini en 2008 (Fiorentini C et al., 2008) evidenció la interacción física entre dichos receptores por medio de estudios de Coimmunoprecipitación en membranas estriatales y en células HEK 293 así como con estudios de Transferencia de Energía de Resonancia por Bioluminiscencia (BRET) en el mismo sistema de expresión heterólogo, con células coexpresando ambos receptores y en su ausencia (Fig. 5).

Interacción física entre los receptores D1R-D3R

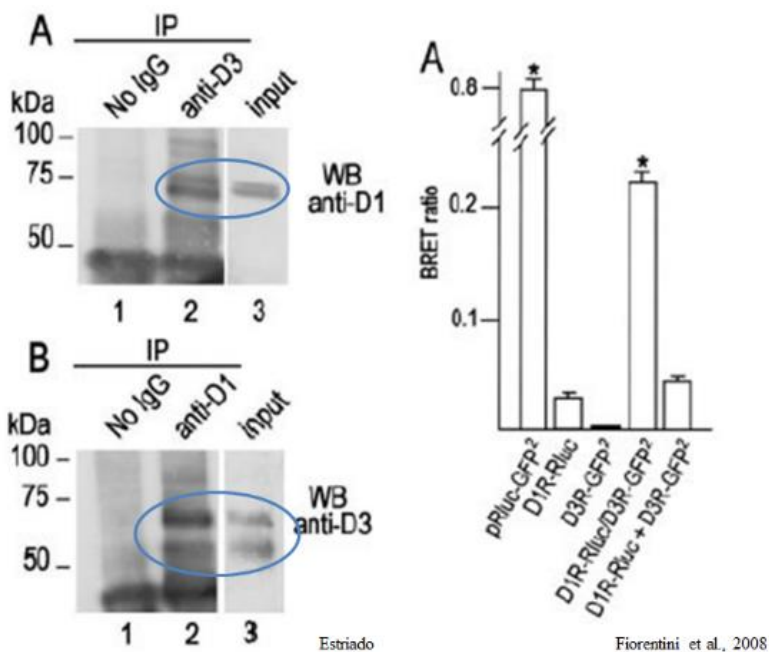


Fig. 5. Interacción física entre los receptores D1 y D3. Modificada de Fiorentini C. et al., 2008. Izquierda A y B, estudios de Coimmunoprecipitación de los receptores D1 y D3. Derecha, imagen representativa de estudios de transferencia de energía bioluminiscente entre los receptores D1 y D3 en sistemas de expresión heterólogos.

5.2 La coactivación del heterodímero D1R-D3R incrementa la potencia del D1R por la DA.

Por otro lado, en el mismo trabajo (Fiorentini et al., 2008) se evidenció un incremento en la potencia de la DA en la estimulación de la Adenilato ciclase a través del D1R en la formación de AMPc. En este sentido, debido a que la liberación de neurotransmisión es un proceso altamente dependiente de la formación de AMPc, en 2013 nuestro grupo de investigación (Avalos-Fuentes A. et al., 2013) corroboró dicho incremento en la potencia del D1R cuando es coactivado con el D3R sobre la liberación de [³H]-GABA (Fig.6).

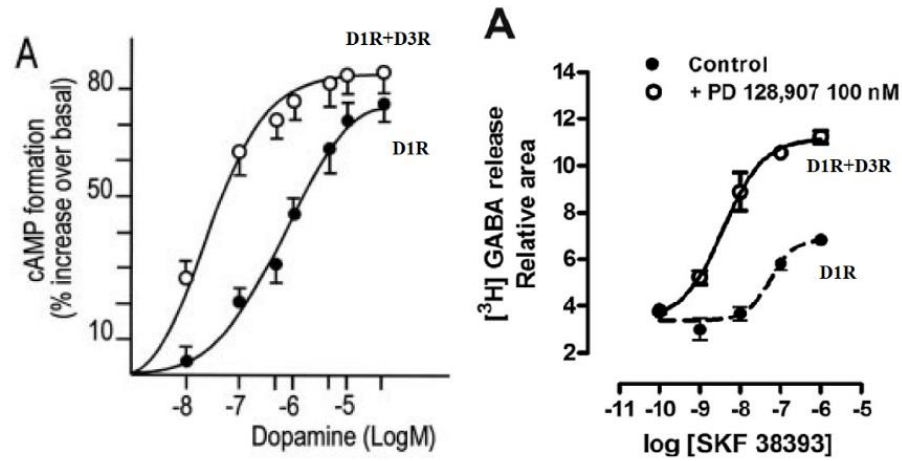
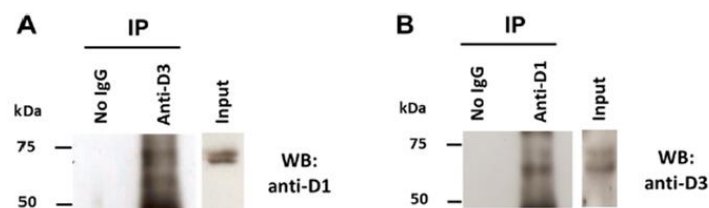


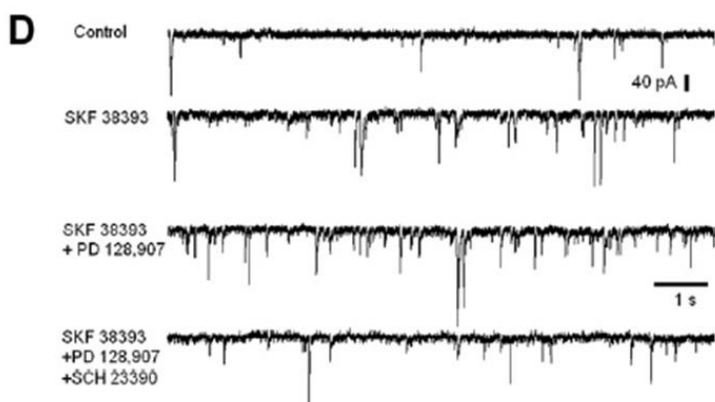
Fig. 6. Efecto potenciador sobre la formación de AMPc en células HEK 293 y liberación de [³H]-GABA en estriado. Modificada de Fiorentini C. et al., 2008 y Avalos-Fuentes A. et al., 2013. Izquierda, formación de AMPc estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de loa D1R y D3R. Derecha, liberación de [³H]-GABA estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de loa D1R y D3R.

En el mismo orden de ideas, nuestro grupo de investigación evidencio la presencia del heterodímero D1R-D3R a nivel de la SNr por medio de experimentos de Coimmunoprecipitación utilizando sinaptosomas de la SNr, así como la funcionalidad de dicho heterodímero evaluando las Corrientes Postsinápticas Inhibitorias Miniaturas GABAérgicas (mIPSCs) en rebanadas de la SNr (Cruz-Trujillo et al., 2013) (Fig. 7).

Interacción física entre los receptores D1R-D3R en sinaptosomas de la SNr



Funcionalidad del heterodímero D1R-D3R en mIPSCs en rebanadas de la SNr



Cruz-Trujillo et al., 2013

Fig. 7. Presencia y funcionalidad del heterodímero D1R-D3R en la SNr. Modificada de Cruz-Trujillo R. 2013. Superior, estudios de Coimmunoprecipitación de los receptores D1 y D3 en sinaptosomas de la SNr de los receptores D1 y D3. Inferior, trazo representativo de estudios de Corrientes Postsinápticas Inhibitorias Miniaturas GABAérgicas (mIPSCs) en rebanadas de la SNr estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de los D1R y D3R.

5.3 Efecto potenciador del D3R sobre los efectos estimulatorios de la activación del D1R sobre la formación de AMPc, liberación de [³H]-GABA y actividad locomotora.

Nuestro grupo de investigación en 2015 (Avalos-Fuentes et al., 2015) evidencio un efecto potenciador del D3R sobre los efectos estimulatorios de la activación del D1R sobre la formación de AMPc y liberación de [³H]-GABA en sinaptosomas de la SNr (Fig. 8).

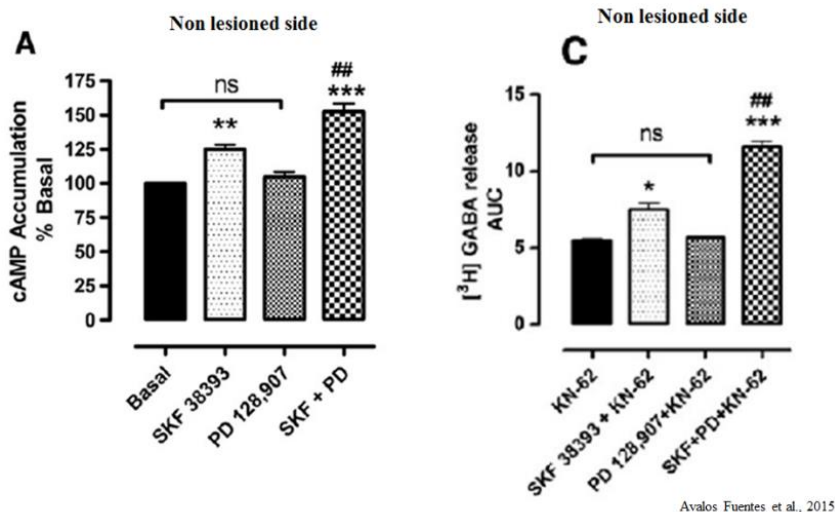


Fig. 8. Efecto potenciador del heterodímero D1R-D3R sobre la formación de AMPc y liberación de [³H]-GABA en sinaptosomas de la SNr. Modificada de Avalos-Fuentes et al., 2015. Izquierda, formación de AMPc estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de los D1R y D3R. Derecha, liberación de [³H]-GABA estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de loa D1R y D3R en presencia del inhibidor de la CaMK II el KN-62. Ambos en el hemisferio no lesionado.

En el mismo sentido, Marcellino en el 2008 (Marcellino et al., 2008) evidencia que dicho efecto potenciador de la activación del heterodímero D1R-D3R se mantiene a nivel de la actividad locomotora, utilizando ratones reserpinizados y K.O. del receptor D3 activando específicamente a los receptores D1 y D3 con sus agonistas específicos (SKF 38393 para el D1R y PD 128,907 para el D3R). Como parte del proceso para obtener mi grado de Maestría en el 2012 (Campos 2012, tesis de maestría) nosotros también evidenciamos el efecto potenciador del heterodímero D1R-D3R sobre la actividad locomotora, para ello utilizamos el modelo de rata reserpinizada y activamos selectivamente los receptores D1 y D3 con los mismos agonistas utilizados por Marcellino (Marcellino et al., 2008) y además utilizamos el 7-OH-DPAT agonista selectivo del D3R obteniendo el mismo efecto potenciador (Fig. 9).

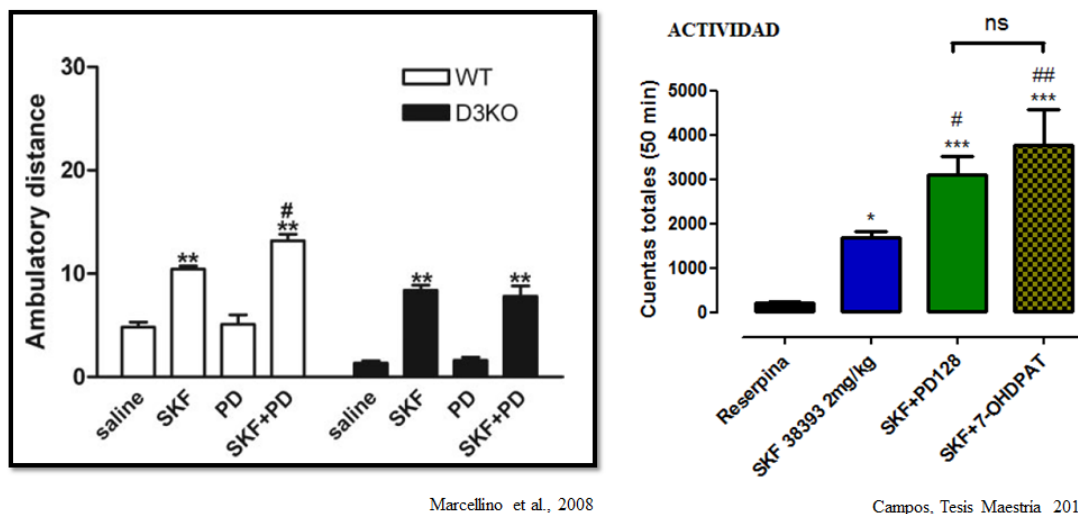


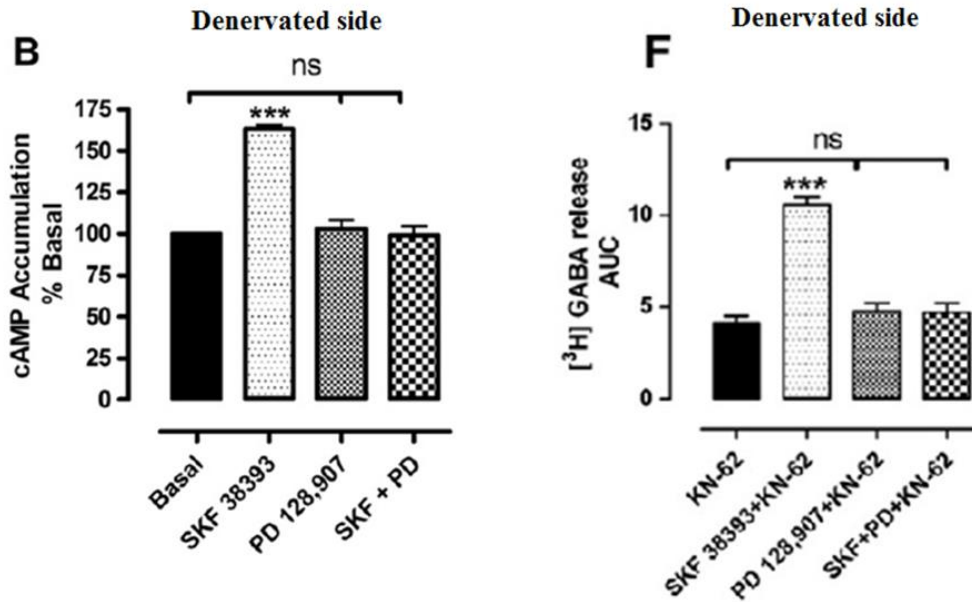
Fig. 9. Efecto potenciador del heterodímero D1R-D3R sobre la actividad locomotora. Modificada de Marcellino et al., 2008 y Campos, Tesis Maestría 2012. Izquierda, actividad locomotora estimulada por la activación de los D1R y coactivación de los D1R y D3R en ratones K.O. del D3R reserpinizados. Derecha, actividad locomotora estimulada por la activación de los D1R y coactivación de los D1R y D3R en ratas reserpinizadas.

6. SEÑALIZACIÓN TÍPICA Y ATÍPICA DEL RECEPTOR D3.

En regiones donde el D3R está coexpresando con el D1R se han descrito 2 distintas interacciones funcionales. En la primera, de acuerdo con su acople típico a proteínas Gi, el receptor D3 antagoniza las respuestas mediadas por el D1R, se ha reportado en las Islas de Calleja (Ridray et al., 1998; Schwartz et al., 1998; Liu et al., 2009). En la segunda, el receptor D3 potencia las respuestas mediadas por el D1R, se ha reportado en el núcleo accumbens shell, en estriado dorsal y en sus proyecciones hacia la sustancia nigra reticulata (Barik y beaurepaire 1998; Ridray et al., 1998; Schwartz et al., 1998; Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008; Cruz-Trujillo et al., 2013; Avalos -Fuentes et al., 2013). Interesantemente, la segunda interacción parece ser dimérica (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008). Por lo anterior, la primera señalización del D3R se nombró “típica” y la segunda “atípica” (Griffon et al., 1997; Schwartz et al., 1998).

6.1 Denervación dopaminérgica cambia la señalización del receptor D3

Se ha evidenciado que la denervación dopaminérgica, particularmente en el estriado dorsal, en modelo de rata denervada con 6-OHDA en el haz del cerebro medio cambia la señalización del D3R de “atípica” a “típica” (Fig. 10), es decir, el D3R antagoniza las respuestas mediadas por el D1R en la formación de AMPc y liberación de [³H]-GABA en sinaptosomas de la SNr por un mecanismo no conocido (Avalos-Fuentes A. et al., 2015).



Ávalos Fuentes et al., 2015

Fig. 10. La denervación dopaminérgica cambia la señalización del D3R de “atípica” a “típica”. Modificada de Avalos-Fuentes A. et al., 2015. Izquierda, formación de AMPc estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de los D1R y D3R. Derecha, liberación de [³H]-GABA estimulada por la activación de los D1R y la coactivación de loa D1R y D3R en presencia del inhibidor de la CaMK II el KN-62. Ambos en el hemisferio lesionado.

6.2 Heterodímero D1R-D3R presente tras denervación dopaminérgica en Estriado y SNr.

Una posible explicación en el cambio de la señalización de “atípica” a “típica” del receptor D3 es que tras la denervación dopaminérgica el heterodímero D1R-D3R ya no está presente o haya sufrido su disociación a entidades monoméricas, sin embargo, Farré en 2015, por medio de ensayos de proximidad de ligando, prueba considerada necesaria para evidenciar la interacción física entre 2 proteínas en sistemas nativos (PLA), demuestra que después de la denervación dopaminérgica con 6-OHDA en Estriado de rata (Fig. 11) así como en el núcleo Caudado y Putamen de primates tratados con MPTP (Fig. 12) la interacción física entre los receptores D1 y D3 se mantiene (Farré D. et al., 2015).

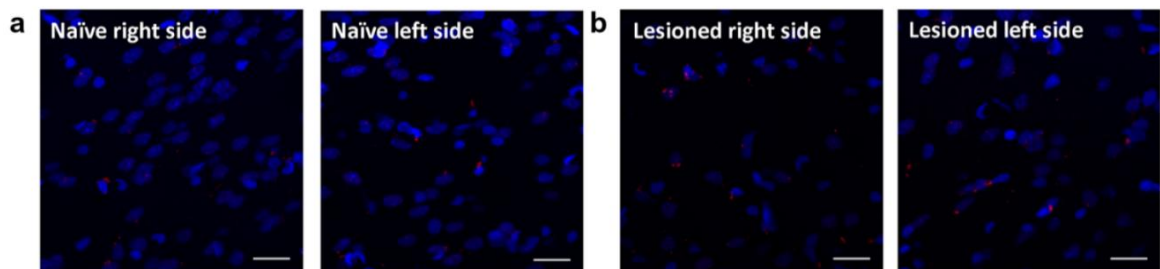


Fig. 11. Prueba positiva (puntos rojos) de PLA para el heterodímero D1R-D3R en estriado de rata denervada con 6-OHDA. Modificada de Farré et al., 2015. En a) imagen representativa de estudios de PLA de estriado de ratas sham y en b) imagen representativa de estudios de PLA de estriado ratas denervadas con 6-OHDA.

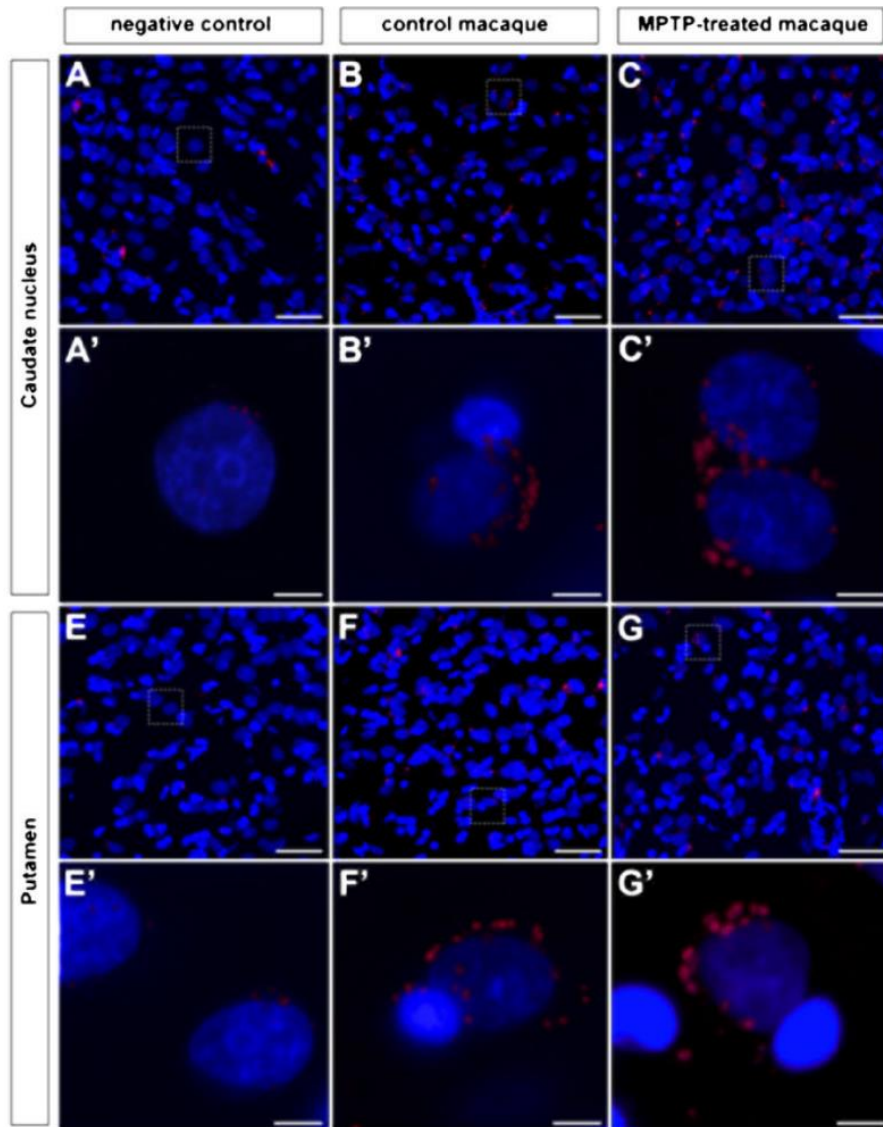


Fig. 12. Prueba positiva (puntos rojos) de PLA para el heterodímero D1R-D3R en Caudado y Putamen de primates tratados con MPTP. Modificada de Farré D. et al., 2014. Imagen izquierda, control negativo con sus acercamientos. Imagen media, macaco control. Imagen derecha, macaco tratado con MPTP.

Para evidenciar que el heterodímero D1R-D3R aún está presente en las terminales del estriado hacia la SNr (sitio de interés de nuestro proyecto), después de la denervación dopaminérgica con 6-OHDA, nuestro equipo de investigación realizó experimentos de Coimmunoprecipitación de los receptores D1 y D3 en sinaptosomas de la SNr (Fig. 13) (Loya-López, Tesis de Maestría 2012). Demostrando que dicha interacción D1R-D3R se mantiene a nivel de la SNr tras la denervación dopaminérgica.

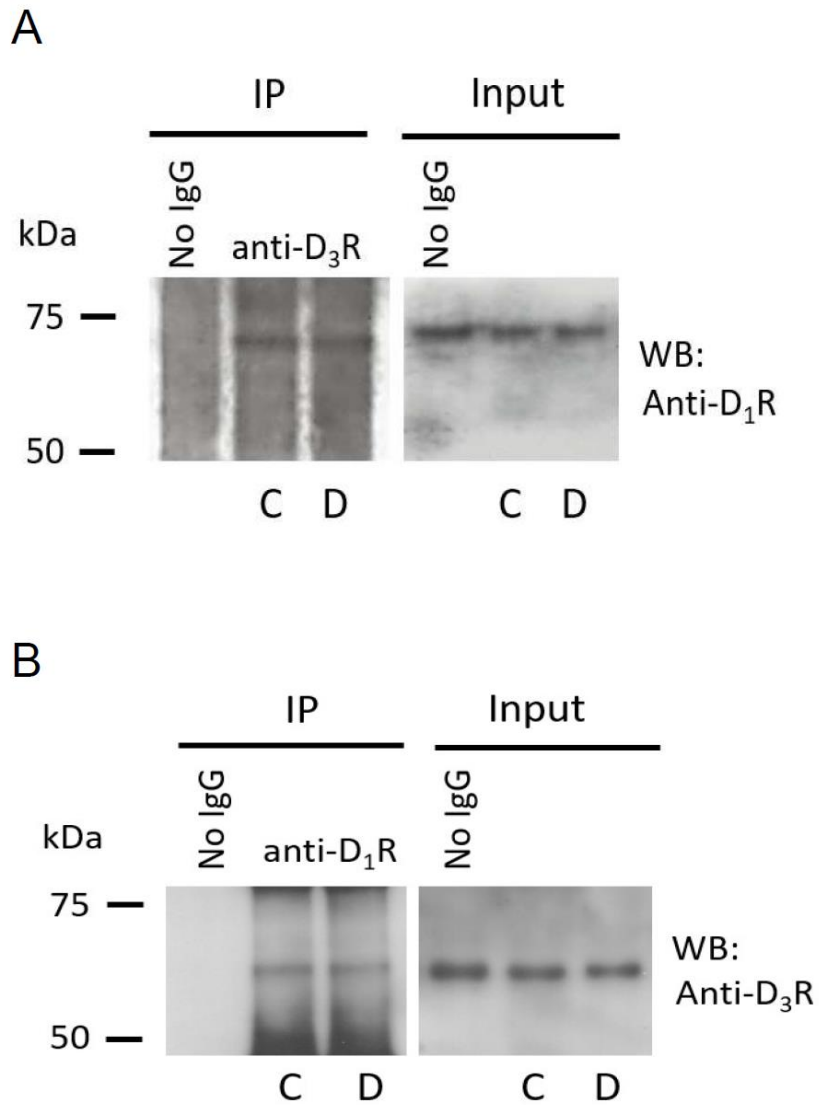


Fig. 13. Resultados de experimentos de Coimmunoprecipitación de los receptores D1 y D3 en sinaptosomas de la SNr en el hemisferio control (C) y en el hemisferio denervado (D). Modificada de Loya-López, Tesis de Maestría, 2012. Imágenes representativas de experimentos de Coimmunoprecipitación en sinaptosomas de la SNr. En A) se muestra la inmunoprecipitación del D3R y el western blot contra el D1R, con una banda de control negativo sin anticuerpo primario además del input en B) la maniobra inversa.

7. ISOFORMAS DEL RECEPTOR D3.

La familia de receptores tipo D1 no posee intrones en sus genes, lo que da como resultado la expresión única de un D1R y un D5R, en contraste, la familia de receptores tipo D2 están codificados por genes que contienen intrones, proporcionando la oportunidad para la producción de diferentes transcriptos y por lo tanto de diferentes proteínas por medio de splicing alternativo.

Los genes para la familia de receptores tipo D2 están transcritos en el núcleo celular en RNA-hetero nuclear (hn RNA o pre-mRNA). Este transcrito primario pre-RNA contiene secuencias para exones o secuencias de proteínas expresadas e intrones o secuencias de interferencia que no codifican a proteína (Richtand et al., 2005). El splicing alternativo es llevado a cabo en el núcleo celular por el complejo multiproteico conocido como Spliceosoma y es el proceso por el cual las secuencias intrónicas de RNAm que no codifican proteínas son removidas llevando a la formación de un RNAm maduro y funcional. Durante este proceso de splicing, secuencias exónicas individuales pueden ser incluidas o excluidas; el sitio de iniciación para codificar una proteína puede ser alterado; los exones pueden ser empalmados juntos de tal manera que la porción de la secuencia que codifica la proteína puede ser removida; también, los exones pueden ser empalmados juntos de tal manera que un nuevo marco de lectura puede ser generado, llevando a la formación de una secuencia proteica diferente; o, raramente, las secuencias intrónicas pueden ser retenidas en el RNAm maduro y funcional.

En este sentido, debido al gran número de posibles combinaciones, el splicing alternativo proporciona el potencial para incrementar significativamente la diversidad funcional de una proteína dada. (Lee C.J. et al., 2003 y Maniatis T. et al., 2002).

7.1 Dominios estructurales involucrados en la función de los receptores

Los receptores dopaminérgicos median la modulación inducida por ligandos sobre la señalización de segundos mensajeros a través de distintos dominios funcionales. La unión del ligando se logra a través de interacción del ligando con una hendidura formada principalmente por siete dominios hidrofóbicos altamente conservados en la membrana plasmática. (Javitch J.A. et al., 1995; Oprian D.D. et al., 1992 y Strader C.D. et al., 1994). La tercera asa intracelular se extiende entre los dominios transmembranales 5 y 6 es más variable, permitiendo una mayor diversidad funcional entre los subtipos de receptores. Las interacciones entre los receptores y su proteína G ocurren a través de la interacción con esta tercera asa intracelular y también en la región del segundo dominio transmembranal (Strader C.D. et al., 1987; Kobilka B.K. 1988 y Bockaert J. 1991). Los receptores dopaminérgicos se cree que existen en estructuras multiméricas de orden elevado (Angers S. et al., 2002; Lee S.P. 2000-a; Scarcelli M. et al., 2001, Nimchinsky et al., 1997; Zawarynski P. et al., 1998; Lee S.P. 2000-b y Ng G.Y. et al., 1996). Se cree que la dimerización de receptores se alcanza a través de interacciones intermoleculares no covalentes específicas requiriendo al menos un dominio transmembranal completo, además de enlaces intermoleculares disulfuro (Lee S.P. et al., 2000-a; Ng G.Y. et al., 1996 y Wang Z.Z. et al., 1996).

Alteraciones en la secuencia proteica estructural primaria resultado del splicing alternativo pueden conducir a alteraciones predecibles en la función del receptor y también puede conducir a alteraciones en la estructura proteica secundaria y terciaria, así como en la función del receptor, que puede ser difícil de predecir por los cambios en la secuencia proteica primaria. Las consecuencias funcionales del splicing alternativo sobre el receptor puede incluir alteraciones en las propiedades de unión al ligando, vías de señalización, eficiencia de acople a proteínas G, localización del receptor y expresión temporal de receptores. Una de las mayores áreas en las cuales la función del receptor puede expandirse a través del splicing alternativo puede ser la desensibilización de los receptores, el tráfico y la internalización, lo cual representa un importante tipo de regulación de la función de receptores acoplados a proteínas G (Richtand et al., 2005).

7.2 Splicing alternativo del receptor D3.

El RNAm y la proteína del D3R están expresados primariamente en el tubérculo olfatorio, núcleo accumbens, islas de Calleja, sustancia nigra, tegmentum ventral y corteza prefrontal (Richtand N.M et al., 1995; Khan Z.U. et al., 1998; Levesque D. et al., 1992; Bouthenet M.L. 1991; Landwehrmeyer B. et al., 1993; Gurevich E.V. et al., 1999; Levant B. 1998 y Diaz J. et al., 2000), regiones cerebrales límbicas filogenéticamente antiguas vinculadas a comportamientos motivados y emocionales. Los primeros informes que describen el patrón de expresión altamente restringido del receptor D3 sugirieron un papel de este receptor en la psicosis (Sokoloff P. et al., 1990 y 1992). La función del receptor D3 es de particular interés porque la evidencia sugiere que sus efectos son principalmente inhibitorios (Betancur C. et al., 2001; Xu M. et al., 1997; Accili D. et al., 1996; Ekman A. et al., 1998; Menalled L.B. et al., 1999 y Flores G. et al., 1996), pérdida de dicha función inhibitoria podría contribuir patológicamente enfermedades neuropsiquiátricas (Flores G. et al., 1996; Richtand N.M. 2001-a y 2001-b).

El gen único que codifica para el receptor D3 está organizado para permitir la producción de diferentes transcritos a través de dos tipos distintos de empalme alternativo de RNA heteronuclear del receptor D3 (RNA hn o pre-mRNA) en el núcleo celular (Griffon N. et al., 1996; Fu D. et al., 1995; Giros B. et al., 1991 y Park B.H. 1995). Al menos siete variantes de splicing alternativo distintas del receptor D3 son producidas (Fig. 14).

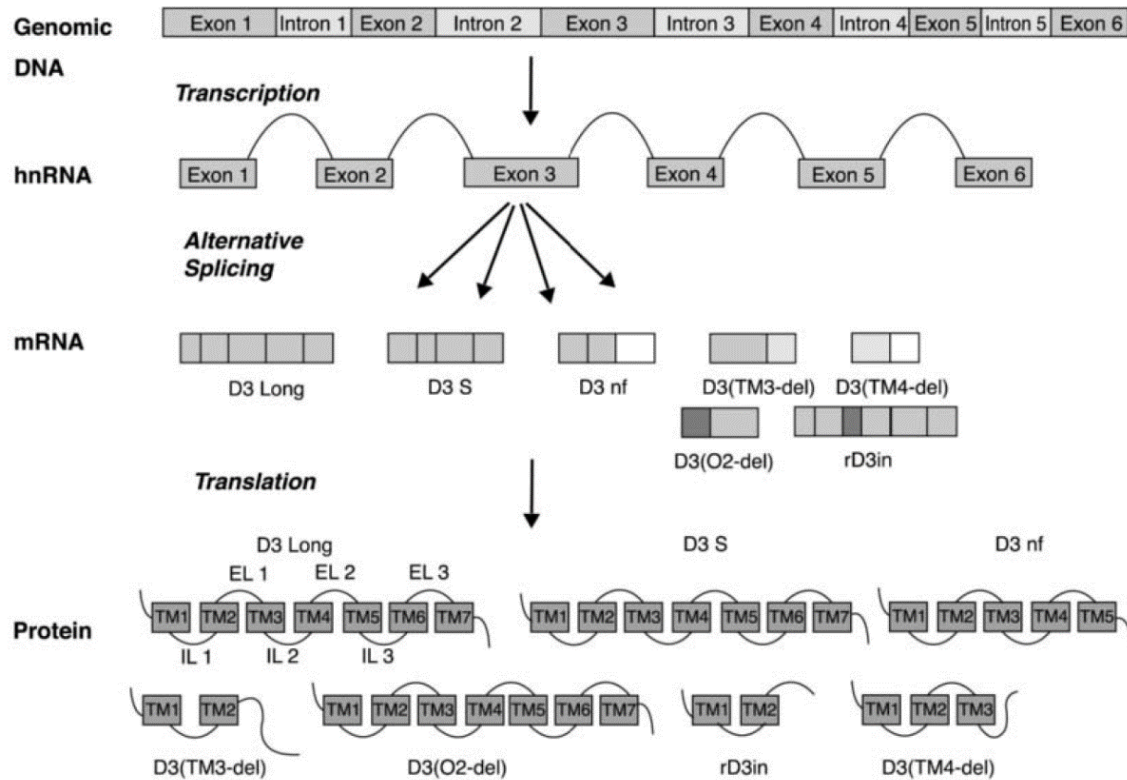


Fig. 14 Splicing Alternativo del receptor D3. Tomada de Richtand N.M. et al., 2005. En la imagen se representan las 7 isoformas del D3R generadas por medio de splicing alternativo: D3 Long, D3 Short, D3nf, D3(TM3-del), D3(O2-del), rD3in y el D3(TM4-del).

En el receptor D3, es llevado a cabo un evento clásico de splicing alternativo con sitios de empalme donadores y aceptores dentro de la tercera asa intracelular resultando en la formación ya sea de un D3R largo (llamado “D3”), o una isoforma más corta, D3S (short) carente de 21 aminoácidos (Fig. 14). Ambos, D3R y D3RS exhiben una alta afinidad por la unión a dopamina (Fishburn C.S. et al., 1993).

Un conjunto distinto de eventos de empalme conduce a la formación de variantes truncadas del receptor D3 o isoformas. Estos eventos de empalme implican la escisión en una secuencia 3' inusual y sin consenso (Liu K. et al., 1994). Se han descrito cinco variantes adicionales de splicing alternativo, que no ligan dopamina, y se cree que funcionan en su lugar a través de la regulación de la dimerización del receptor (Snyder L.A. et al., 1991) y su localización (Karpa K.D. et al., 2000). Estas variantes incluyen D3 (TM-del) (Giros B. et al., 1991 y Snyder L.A. et al., 1991), D3 (TM4-del) (Nagai Y. et al., 1993), D3 (O2-del) (Giros B. et al., 1991), rD3in (Pagliusi S. et al., 1993), and D3nf (Fig. 14 y 15) (Liu K. et al., 1994 y Schmauss C. et al., 1993).

Receptor	Isoform	Splice site location	Functional effect	Physiological effect	Reference
D3	D3 (short)	Third cytoplasmic loop	High-affinity dopamine binding intact	Unknown	84
	D3 (TM3-del)	Third transmembrane domain	No dopamine binding	Unknown	82,86
	D3 (TM4-del)	Fourth transmembrane domain	No dopamine binding	Unknown	88
	D3 (O2-del)	Second extracellular loop and fifth transmembrane domain	No dopamine binding	Unknown	82
	rD3in	First extracellular loop	No dopamine binding	Unknown	89
	D3nf	Third cytoplasmic loop	No dopamine binding; altered membrane trafficking of D3	Potential involvement in development of behavioral sensitization and psychosis	85,90

Fig. 15. Isoformas del D3R, ubicación del sitio del splicing alternativo de las isoformas del receptor D3, su efecto funcional y su efecto fisiológico. Modificada de Richtand N.M. et al., 2005.

7.3 Isoforma D3nf y su interacción física con el receptor D3.

D3nf es la isoforma mejor caracterizada de dichas variantes que no se une a dopamina. El D3nf es formado por la delección de 98 pares de bases en la tercera asa intracelular, causando un cambio en el marco de codificación dando como resultado la creación de un nuevo péptido de 55 aminoácidos diferente de las demás isoformas, y la aparición de un nuevo codón de paro prematuro. Por lo tanto, la proteína prematuramente truncada carece de los dominios transmembranales 6 y 7 (Liu K. et al., 1994 y Schmauss C. et al., 1993) y no se une a dopamina (Fig. 16) (Elmhurst J.L. et al., 2000).

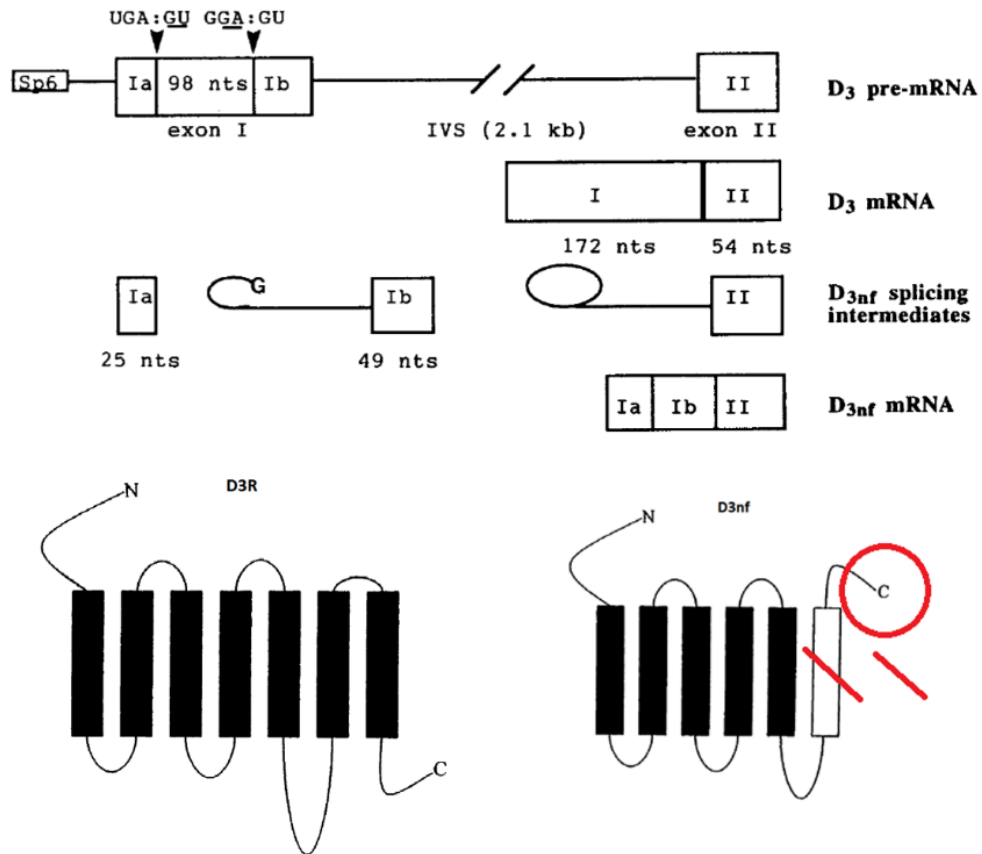


Fig. 16. Splicing alternativo del RNAm del D3R. Modificada de Schmauss C. 1996. Imagen superior, splicing alternativo del pre-RNAm del receptor D3. Imagen inferior; productos proteicos obtenidos D3R (izquierda) y D3nf (derecha).

El RNAm y la proteína del D3nf se expresan en cerebro de rata, mono y humano (Fig. 17) (Nimchinsky E.A. et al., 1997; Liu K. et al., 1994). Importantemente, La naturaleza altamente conservada del splicing del D3nf y la expresión de su proteína, tanto en rata como en humano, sugiere que el D3nf probablemente tiene una importante función biológica, aunque actualmente es desconocida.

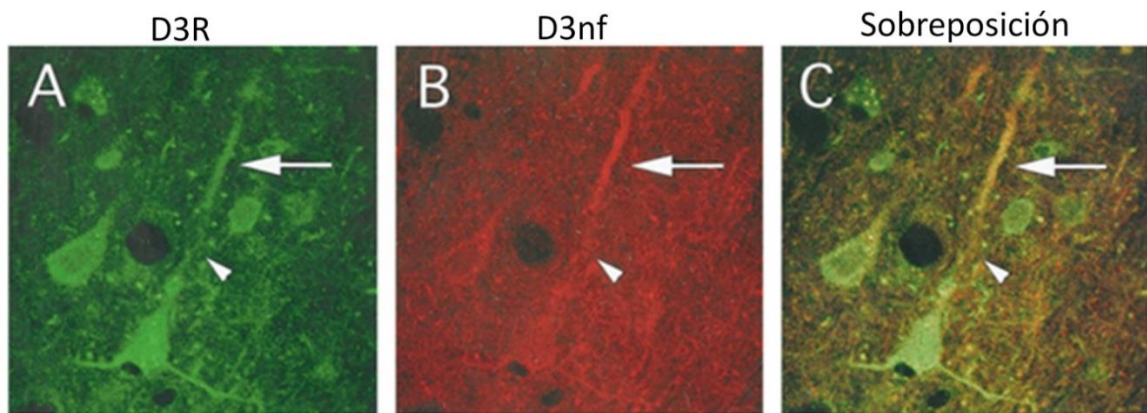


Fig. 17. Expresión y colocalización del receptor D3 con su isoforma D3nf en corteza sensoriomotora de rata. Modificada de Nimchinsky 1997. En A) marca positiva para el D3R, en B) marca positiva de la isoforma D3nf y en C) la superposición, todos en corteza sensoriomotora de rata.

Por otro lado, existe evidencia de al menos tres laboratorios en donde demuestran que el D3nf interacciona físicamente con el D3R (Fig. 18) (Nimchinsky E.A. et al., 1997; Karpa K.D. et al., 2000 y Elmhurst J.L. et al., 2000).

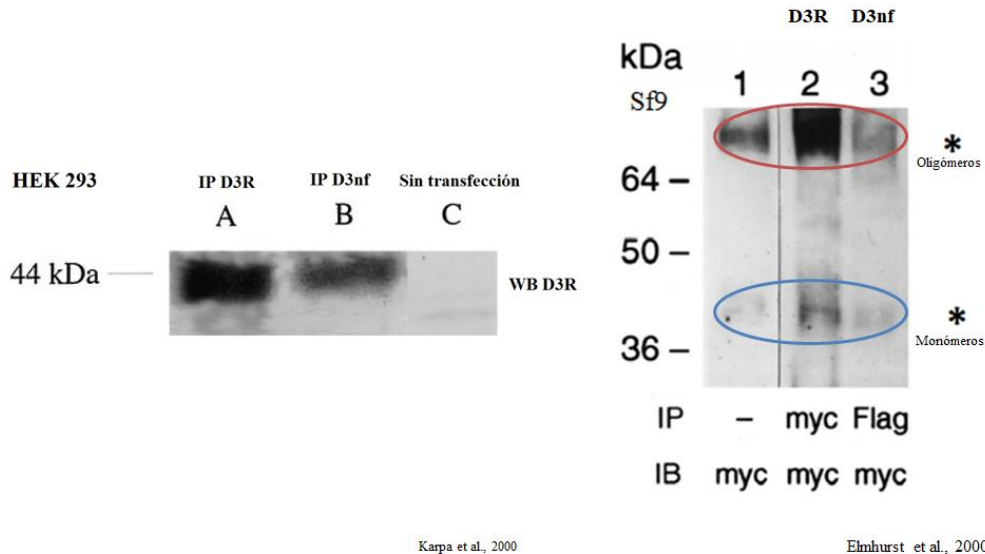


Fig. 18. Estudios de Coimmunoprecipitación del receptor D3 con su isoforma D3nf. Modificada de Karpa K.D. et al., 2000 y Elmhurst J.L. et al., 2000. Izquierda células HEK 293, A) inmunoprecipitación del D3R western blot contra D3R, en B) inmunoprecipitación de la isoforma D3nf western blot contra el D3R y en C) células sin transfectar. Derecha células Sf9, carril 1; sin inmunoprecipitación western blot contra el D3R, carril 2; inmunoprecipitación del D3R western blot contra el D3R y en carril 3; inmunoprecipitación de la isoforma D3nf western blot contra el D3R, con 2 bandas en los 3 carriles representando las formas monoméricas y diméricas.

7.4 Modulación negativa de la isoforma D3nf sobre el receptor D3.

La expresión del D3nf inhibe la unión de la dopamina al receptor D3 (Fig. 15 y 19) (Elmhurst J.L. et al., 2000), y también redirige la localización del receptor D3 lejos de la membrana plasmática, hacia un compartimento intracelular hasta el momento desconocido (Karpa K.D. et al., 2000), mecanismo de modulación negativa de la isoforma D3nf sobre el D3R, por el cual se podría explicar la sensibilidad conductual a anfetamina evidenciada en el trabajo de Richtand N.M. et al., 2006 (Fig. 19).

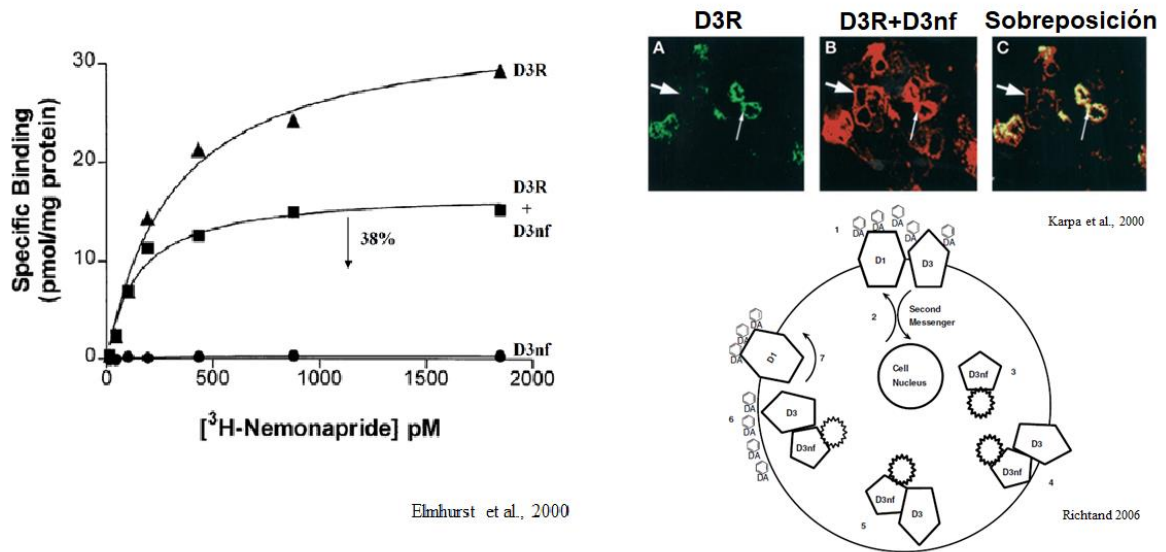


Fig. 19. Modulación negativa de la isoforma D3nf sobre el receptor D3. Modificada de Karpa K.D. et al., 2000, Elmhurst J.L. et al., 2000 y Richtand N.M. 2006. Izquierda, ensayo de unión de radioligando [³H]-Nemonaprida del D3R en células transfectadas con el D3R y células cotransfectadas con el D3R y su isoforma D3nf. Superior derecha, A) inmunofluorescencia de células transfectadas con el D3R (distribución membranal), en B) células cotransfectadas con el D3R y su isoforma D3nf (distribución membranal y citoplásmica) y en C) la sobreposición. Inferior derecha, mecanismo de modulación de la isoforma D3nf sobre el D3R y su efecto sobre la sensibilización del D1R a anfetamina.

Es importante destacar que la expresión de RNAm del receptor D3 disminuye en la corteza de los pacientes con esquizofrenia (Schmauss C. et al., 1993), mientras que se observó una mayor eficiencia en el splicing de la isoforma D3nf en la corteza del tejido *post mortem* de pacientes con esquizofrenia crónica (Fig. 20) (Schmauss C. et al., 1996).

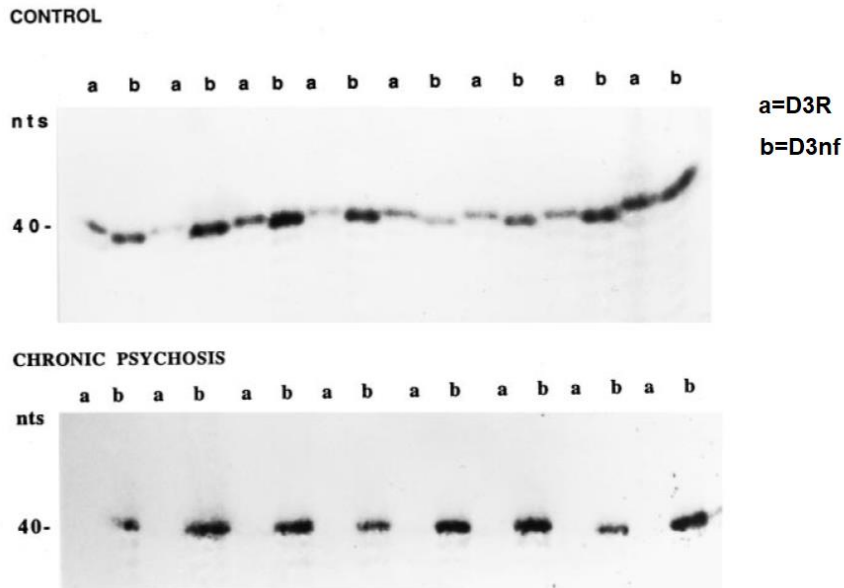


Fig. 20. RNAm de la isoforma D3nf incrementa en corteza de tejido *post mortem* de pacientes con Esquizofrenia crónica. Modificada de Schmauss C., 1996. Superior, Northern blot del RNAm del D3R (a) y su isoforma D3nf (b) en sujetos control post mortem. Inferior, Northern blot del RNAm del D3R (a) y su isoforma D3nf (b) en pacientes post mortem con esquizofrenia crónica.

Estos hallazgos sugieren que una mayor expresión de la isoforma D3nf puede contribuir a estados funcionales de actividad dopaminérgica alterada. Sin embargo, también están los estudios realizados por Prieto y colaboradores en el 2011 en donde observan que tras la denervación unilateral dopaminérgica en ratas inyectadas con 6-OHDA en el haz del cerebro medio disminuyen los niveles de expresión proteicos de la isoforma D3nf sin alterar la expresión del receptor D3 en el núcleo estriado (Fig. 21), (Prieto G.A. et al., 2011).

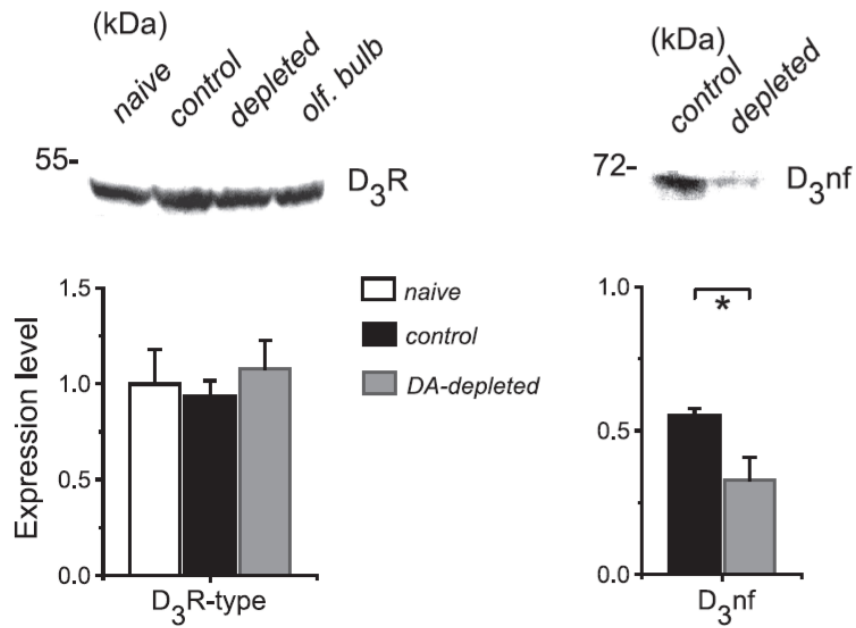


Fig. 21. Expresión proteica del receptor D3 y de su isoforma D3nf en estriado de ratas denervadas. Modificada de Prieto G.A. et al., 2011. Izquierda, Western blot representativo del D3R en estriado de ratas denervadas con 6-OHDA. Derecha, Western blot representativo de la isoforma D3nf en estriado de ratas denervadas con 6-OHDA.

Por todo lo anterior, estos antecedentes evidencian que la isoforma D3nf es sensible a los cambios en el tono dopaminérgico del sistema; incrementando su expresión en tonos hiperdopaminérgicos (esquizofrenia) y disminuyendo sus niveles de expresión en tonos hipodopaminérgicos (enfermedad de Parkinson).

Colectivamente, estos estudios sugieren que, la dimerización de la isoforma D3nf con el receptor D3 podría regular o modificar la señalización dopaminérgica (Richtand N.M. et al., 2005). Por otro lado, existe un vacío importante en nuestra comprensión actual de la función del receptor D3 en parte debido a la falta de información sobre la aparición de alteraciones en la expresión de la isoforma D3nf en estados funcionales alterados.

8 JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que representa la modulación del sistema dopaminérgico sobre los ganglios basales y por ende en la actividad locomotora, es de suma importancia conocer los posibles mecanismos de acción involucrados en dicha modulación, así como su extrapolación a estados patológicos neurodegenerativos como la EP, enfermedad que hasta la fecha no tiene cura, se desconoce el mecanismo de acción de la L-Dopa y a su vez por qué se genera su principal efecto secundario (discinesias inducidas por L-Dopa). El estudio detallado del sistema dopaminérgico ayudara a desarrollar terapias farmacológicas dirigidas a los diferentes estadios de la enfermedad.

9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel del receptor D3 sobre la actividad locomotora es abrumadoramente complejo y paradójico. Dado que la isoforma D3nf actúa como un modulador negativo sobre la expresión del receptor D3 en la membrana plasmática y a su vez, disminuye su propia expresión en el Parkinson experimental, es de suma importancia conocer el papel de dicha isoforma sobre la modulación de la señal dopaminérgica, específicamente la señalización tras la activación de los receptores D1, D3 y/o, así como sus posibles conformaciones diméricas; D1R-D3R.

10 HIPÓTESIS

La expresión de la isoforma D3nf modula negativamente la presencia de D3R membranales y en consecuencia la función del heterodímero D1R-D3R en terminales estriado nigrales de ratas denervadas con 6-OHDA.

11 OBJETIVO GENERAL

Entender la participación de la isoforma D3nf en el control de la actividad dimérica D1R-D3R en condiciones normales y de Parkinson experimental.

12 OBJETIVOS PARTICULARES

Se evaluará en condiciones de denervación dopaminérgica los siguientes objetivos particulares:

- Cambios de expresión génica del D3R y la isoforma D3nf en estriado de rata por medio de qRT-PCR.

- Cambios en la expresión proteica del D3R y de la isoforma D3nf en Estriado y SNr de rata por medio de Western Blot.

- Cambios en afinidad y/o densidad de D3R membranales por medio de ensayos de unión a radioligando (Binding) con [³H]-7-OH-DPAT en Estriado de rata.

- La interacción física de los D3R-D3nf en Estriado y SNr de rata por medio de ensayo de proximidad de ligando (PLA).

- La modulación funcional de la isoforma D3nf sobre el heterodímero D1R-D3R por medio de experimentos de formación de AMPc y liberación de [³H] GABA en Estriado y SNr de rata.

- Evidenciar el cambio en la vía de señalización del heterodímero D1R-D3R por medio de conducta de giro en ratas lesionadas con 6-OHDA canuladas a nivel de la SNr, y posteriormente desenmascarar el efecto potenciador del heterodímero en presencia del NEM, es decir, de señalización típica a señalización atípica.

13. MATERIAL Y MÉTODOS

13.1 Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal de 200-250g alojadas 5 por jaula con agua y comida *ad libitum* y se mantuvieron bajo el ciclo natural de luz mientras se utilizaron. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud de U.S.A. para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el comité Institucional de Cuidado Animal del CINVESTAV, se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

13.2 Lesión con 6-OHDA.

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de Ketamina/Xilacina (75/5mg/kg i.p.) y se fijaron a un estereotáxico David Kopf, se expuso el cráneo, se realizó un trepano y se administró la 6-hidroxidopamina (6-OHDA; 16µg/µl de salina conteniendo 0.1% de ácido ascórbico) en el haz del cerebro medio con coordenadas (Anterior= -1.8, Lateral= 2.4 y Ventral= -7mm) de acuerdo con el Atlas de Paxinos (1997) (Fig. 22). Las ratas fueron pretratadas con Desipramina (10 mg/kg i.p.) 40 minutos previos a la cirugía para prevenir daño a las neuronas noradrenérgicas. Las ratas usadas para todos nuestros experimentos se seleccionaron por la conducta de giro inducida por anfetamina para asegurar la homogeneidad de la lesión entre los diferentes grupos experimentales. 8 días posteriores a la cirugía, se les administro una dosis de anfetamina de 8 mg/kg i.p. a los animales y se les evaluó la conducta de giro ipsilateral durante 60 minutos. (Avalos-Fuentes A. et al., 2015). Solo las ratas que presentaron 8 o más giros ipsilaterales por minuto durante 60 minutos fueron seleccionadas para todos nuestros experimentos para asegurar una severidad en la lesión de al menos el 85% (Albarrán S. et al., 2019). Se removieron los cerebros para realizar rebanadas de los animales seleccionados 16 días después de la lesión con 6-OHDA.

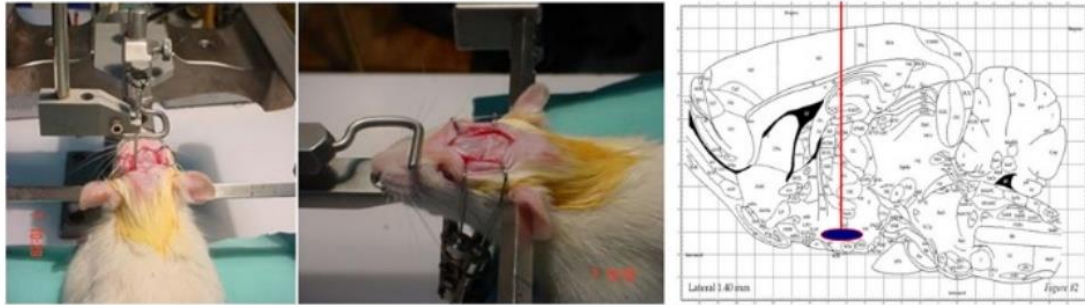


Fig. 22. Fotografías de una cirugía estereotáxica y diagrama del sitio de inyección de la 6-OHDA.

13.3 Obtención de las rebanadas de cerebro.

Después de una rápida decapitación, los cerebros se removieron y fueron sumergidos en fluido cerebro espinal artificial frío (aCSF), con la siguiente composición (mM): 118.25 de NaCl, 1.75 de KCl, 1 MgSO, 1.25 KH₂PO₄, 25 de NaHCO₃, 2 de CaCl y 10 de D-glucosa. Posteriormente se pegó el cerebro a una placa Petri montada en un cubo metálico con sCSF frío y se realizaron cortes de rebanadas de cerebro (300- μ m de grosor) conteniendo los núcleos cerebrales de interés; el estriado y la SNr con un vibratomo (Campden Inc., Cambridge, UK). Las rebanadas se transfirieron a portaobjetos fríos y por medio de un microscopio estereoscópico se realizó la micro disección del estriado y la SNr separando los hemisferios no lesionados (controles) de los hemisferios denervados.

13.4 Preparación de Sinaptosomas

La fracción sinaptosomal se aisló de la SNr de 20 ratas. Utilizamos el método descrito por Alexander (1995) y adaptado por Rangel et al., 2011. Se homogenizaron las rebanadas en un buffer (sucrosa, 0.32 M; HEPES, 0.005 M, pH 7.4), posteriormente, se centrifugaron los homogenados a 800 G durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se centrifugo nuevamente a 20,000 G durante 20 minutos. De esta segunda centrifugación el sobrenadante (S1) se descartó y el pellet (P1) fue suspendido y colocado en un buffer de sucrosa 0.8 M; HEPES, 0.005 M, pH 7.4 y nuevamente centrifugados a 20,000 G durante 20 minutos. Finalmente, el sobrenadante se descartó y el nuevo Pellet (P2) conteniendo los sinaptosomas fue el usado.

13.5 Determinaciones de RTq-PCR

Se extrajo el RNA total de tejido estriatal usando la técnica del Trizol (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El RNA se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, USA), y se confirmó su integridad usando electroforesis en geles de agarosa. El cDNA se obtuvo de 5 µg de RNA total usando 1 µl del kit de transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), 1 µl de Oligo dT 50 µM, 1 µl de la mezcla de dNTP 10 mM, y agua grado biología molecular a 13 µl. Las condiciones de la transcripción reversa fueron las siguientes: desnaturalización a 70 °C por 10 minutos, hibridación a 42°C por 5 minutos, síntesis de cDNA a 55 °C por 50 minutos y posteriormente a 70 °C por 15 minutos, eliminación de RNA a 37 °C por 20 minutos. Finalmente, se agregó 1 µl de RNasa H (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) y se incubaron las muestras a 37 °C por 20 minutos. El cDNA fresco se utilizó para amplificar cada gen evaluado utilizando sondas TaqMan para el receptor D3 (Forward: 5'-CGTGGAAAGGACTCGGAACTC-3', Reverse: 5'-GTGGATAACCTGCCGTTGCT-3', Sonda: 5'-CCCAAGCTCAGCTTAGAGGTTTCGAA-3', D3nf (Forward: 5'-GGAAGCTCCTTGAGTACCACTTCGA-3', Reverse: 5'-CAATGAAGGCTCCAAGCACAA-3', Sonda: 5'-AGAAGAAGGCCACCCAGATGGTGGTC-3' (Pritchard L.M. et al., 2006). Numero de ensayo TaqMan: D₃R, Rn00567568_m1, D₃nf, AIT96RG y el hipoxantina-guaninafosforribosil-transferasa (Hprt1) Rn01527840_m1, obtenidos de Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Las reacciones de amplificación contienen 0.25 µl de la respectiva sonda TaqMan, 2.5 µl de Master Mix (TaqMan Universal Master Mix; Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), y 2.25 µl de cDNA en un volumen final de 5 µl. Las condiciones para la RTq-PCR fueron; para la desnaturalización 95 °C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Hprt1 de rata se usó como gen constitutivo. El calibrador de referencia en las muestras usadas en este estudio fue el tejido estriatal no denervado de cada rata. Las pruebas de amplificación se realizaron usando un sistema rápido de PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). El análisis de datos se realizó usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen 2001).

13.6 Western Blot

Para detectar la señal del receptor D3 y su isoforma D3nf se utilizaron lisados de proteína total de estriado y sinaptosomas de la SNr (70 µg) se corrieron en SDS-PAGE, posteriormente transferidas a membranas PVDF e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente en buffer salina Tris que contiene; 0.2% de Tween 20 y 5% de leche en polvo sin grasa. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo para el receptor D3 (1:1000) y su isoforma D3nf (1:500). Los anticuerpos policlonales para el receptor D3 y su isoforma D3nf se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology Inc., D3DR (H-50): sc-9114 y D3nf (C-16): sc-9184.

La detección de los anticuerpos se realizó por quimioluminiscencia (ECL Plus Amersham) con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (D3R, 1:5,000 y D3nf, 10,000). La especificidad de los anticuerpos usados a sido reportada por Fiorentini et al., (2008), Everett y Senogles (2010) y Prieto et al., (2011). Como control negativo se utilizó homogenado de ojo de rata que no expresa a el receptor D3. (Fujieda et al., 2003).

Para cuantificar cambios en la expresión proteica del receptor D3 y su isoforma tanto en estriado como en SNr en el hemisferio control y denervado, se realizó un análisis densitométrico primero dividiendo el marcaje de la proteína de interés entre su actina y posteriormente el hemisferio denervado entre el hemisferio control, tomando el hemisferio control como el 100%.

13.7 Binding del receptor D3.

El ensayo de unión a radio ligando (Binding) se adaptó del método previamente descrito por Levesque D. et al., (1992). Las rebanadas de estriado se agruparon y fueron puestas en 4 ml de 50 mM de buffer Tris-HCl conteniendo 1 mM de EGTA (pH 7.4) y se homogenizaron usando 12 golpes con un homogeneizador manual. El homogenado se llevó a 15 ml con el mismo buffer y centrifugado a 25,000 G por 10 minutos a 4 °C. El pellet se resuspendió en 15 ml de buffer y centrifugado nuevamente.

El pellet resultante (preparación membranal cruda) se resuspendió en alícuotas las cuales se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en 0.5 ml de buffer de incubación (Tris-HCl, 50; NaCl₂, 120; KCl, 5; CaCl₂, 2; Na₂S₂O₅, 0.02; todo en mM y Pargilina 10µM a pH 7.4), conteniendo el [³H]-7-OH-DPAT en un rango de 10-30 nM para los experimentos de saturación. Las incubaciones se terminaron por medio de filtración rápida al vacío usando papel de fibra de vidrio GF/glass Whatman empapado previamente con polietilenimina al 0.3%. La unión no específica se determinó incubando con 10 µM de Butaclamol no marcado radiactivamente. El contenido de proteína se determinó usando el método de Lowry y se usó para estimar la unión del radio ligando al receptor en fmol/mg de proteína.

13.8 Ensayo de Proximidad de Ligando (PLA)

Las ratas fueron anestesiadas profundamente con una sobredosis de pentobarbital (4 mg/kg i.p.), posteriormente se realizó una perfusión transcardiaca con solución Ringer seguido de perfusión con Paraformaldehído al 4% (PFA) en 0.1 M de buffer de fosfatos (PBS), pH 7.4. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en PFA 4% por otras 24 horas a 4 °C. Posteriormente el tejido se deshidrató con 0.1 M de PBS con sucrosa al 30% durante 72 horas. Transcurrido dicho tiempo los cerebros se fijaron con Tissue Tech OCT (Miles Inc., Elkhart, IN, USA) y se cortaron en secciones coronales de 30 µM en un microtomo de congelación (Leica, Nussloch, Germany).

Para inmunofluorescencia se utilizó el método de rebanadas en libre flotación; las rebanadas se incubaron con suero de burro al 2%, Tritón X-100 al 0.1% y albumina bovina sérica al 1% en PBS 0.1 M por 2 horas a temperatura ambiente. Para el ensayo de proximidad de ligando (PLA) utilizamos el Kit de detección de PLA *in situ* Duolink II (DUO92101, Sigma-Duolink Bioscience) y se realizó el ensayo de PLA usando el método adaptado de Pacchiana R. et al., (2014). Los tiempos de dilución e incubación se optimizaron para la técnica de rebanadas en libre flotación. Utilizamos el anticuerpo policlonal goat-anti-D3nf (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) y el anticuerpo policlonal rabbit-anti-D3 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) en rebanadas de estriado y SNr de hemisferios denervado y no denervado de 3 ratas lesionadas con 6-OHDA.

Posteriormente, las rebanadas se incubaron bajo agitación suave durante 2 horas a 37 °C con el diluyente para anticuerpos Duolink el cual contiene las sondas secundarias de DNA complementarias a los epítomos de los anticuerpos primarios: Duolink II PLA anti-goat PLUS y Duolink II PLA anti-rabbit MINUS. Después, las muestras se enjuagaron en buffer A a temperatura ambiente (3 cambios en 5 minutos). En el siguiente paso, las rebanadas se incubaron con la solución de ligación durante 1 hora a 37 °C y enjuagadas con buffer A (2 cambios en 2 minutos) las muestras se incubaron con la solución de amplificación durante 100 minutos a 37 °C bajo agitación suave. Finalmente, se lavó las rebanadas con buffer B (3 cambios en 5 minutos) y otro lavado con buffer B (1:100 diluido en PBS). Posteriormente las rebanadas se montaron en un portaobjetos con el medio de montaje Duolink y se selló con un cubreobjetos con resina.

13.9 Microscopia Láser Confocal

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipado con un objetivo apocromático de inmersión de aceite de 63X, con un láser de 405 nm y un láser blanco que emite longitudes de onda en un rango de 470 nm - 670 nm. Se utilizó un escaneo secuencial para prevenir la comunicación cruzada entre los canales en muestras con 2 o más fluoróforos. Todas las imágenes se analizaron usando el paquete Fiji (<http://pacific.mpi-cbg.de>), para calcular la densidad de los núcleos y puntos de PLA de acuerdo a los protocolos establecidos por Bonaventura J. et al., (2014) y Rico A.J. et al., (2017).

Por cada campo un acumulado de 2 canales (1 por tinción) y de 12 a 15 Z acumulados con 1 μm de intervalo z se adquirió. Después de obtener las proyecciones máximas de cada cúmulo de imágenes, los canales se procesaron individualmente. Se cuantificó los núcleos y los puntos rojos de 12 diferentes campos por cada condición experimental (3 animales) Los núcleos se segmentaron con un filtro mediano, eliminando el fondo, aplicando un umbral para obtener una imagen binaria y finalmente se aplicó el plug-in Contador de Núcleos. Las imágenes de los puntos rojos también se filtraron y un umbral se seleccionó manualmente para discriminar los puntos rojos del PLA de la fluorescencia de fondo. Una vez seleccionado dicho umbral, su valor se aplicó uniformemente a todas las imágenes.

Con la finalidad de caracterizar todos los objetos en el umbral de la imagen, se aplicó el built-in macro “Analyze particles”. Objetos mayores de $3\mu\text{m}^2$ se eliminaron. Se aplicó una prueba estadística t-test no pareada para comparar la densidad de la señal de PLA entre los hemisferios intacto y denervado.

13.10 Acumulación de [^3H]-AMPc.

Los experimentos de acumulación de AMPc se realizaron como se describió previamente por Rangel-Barajas C. et al., (2011). Rebanadas de estriado y de SNr se extrajeron con sacabocados e incubados con [^3H]-Adenina (130 nM) durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido ese tiempo las rebanadas se suspendieron en buffer Krebs-Henseleit (K-H) con la siguiente composición en mM: NaCl, 127; KCl, 3.73; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.18; CaCl₂, 1.18; HEPES, 20; glucosa, 11; y 3-isobutilo-1-metilxantina, 1. Las rebanadas con 250 μl de K-H se transfirieron a tubos Eppendorf (3 rebanadas por tubo), y se añadieron los fármacos en un volumen de 10 μl durante 15 minutos para después detener la incubación añadiendo 100 μl de ácido tricloroacético frío al 15% conteniendo ATP no marcado radiactivamente a 2.5 mM y AMPc a 4.5 mM.

Después de un periodo de 20 minutos en hielo, el sobrenadante sin las rebanadas se cargó en columnas Dowex 50W-X4 (300 μl por columna). Una fracción conteniendo [^3H]-ATP se eluyó con 3 ml de agua destilada. Un segundo eluyente obtenido con 5 ml de agua destilada se cargó directamente en columnas de alúmina neutra. Las columnas de alúmina se eluyeron finalmente con 4 ml de buffer Tris-HCl pH 7.4 a 50 mM para obtener [^3H]-AMPc. Los resultados se expresaron como; $[\text{H}^3\text{-AMPc}] \times 100 / [\text{H}^3\text{-AMPc}] + [\text{H}^3\text{-ATP}]$ y se normalizaron de acuerdo a la acumulación basal.

13.11 Liberación de [^3H]-GABA

La liberación de [^3H]-GABA se determinó de acuerdo con los métodos utilizados y descritos a detalle por Nava-Asbell C. et al., (2007).

Rebanadas de estriado y de SNr de 6 y 20 ratas respectivamente se agruparon y se dejaron en reposo por 30 minutos con aCSF a 37 °C en burbujeo con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (95:5 vol./vol.) para posteriormente ser incubadas durante 30 minutos con aCSF conteniendo 80 nM de [³H]-GABA (95 Ci/mmol). Las soluciones de marcaje y perfusión contienen Ácido Amino-Oxiacético a 10 µM para prevenir la degradación de la marca radiactiva por la GABA transaminasa.

Una vez transcurrido el tiempo, el exceso de marca se removió con 2 lavados de aCSF frio conteniendo Ácido Nipecótico 10 µM para prevenir la recaptura del [³H]-GABA. El Ácido Nipecótico se incluyó en todas las soluciones utilizadas en todos los pasos posteriores del experimento. Por cada grupo experimental, las rebanadas se distribuyeron aleatoriamente entre las cámaras de perfusión (80 µl; 20 cámaras de perfusión en paralelo), perfundidas a una tasa de 0.5 ml/minuto. Cada cámara de perfusión conteniendo 3 rebanadas, las cuales se perfundieron con aCSF normal por 30 minutos antes de iniciar la colecta de las fracciones. Para la despolarización de las células, se incrementó el [K⁺] a 15 mM (composición en mM: 101.25 de NaCl, 13.75 de KCl, 1 de MgSO₄, 1.25 de KH₂PO₄, 25 de NaHCO₃, 2 de CaCl₂ y 10 de D-glucosa). Los perfundidos se colectaron en un colector de fracciones cada 4 minutos. Para determinar la cantidad total de Tritio restante en el tejido al término del experimento, las rebanadas de colectaron y se trataron con 1 ml de HCl durante al menos 1 hora antes de añadirse el líquido de centelleo y realizar el conteo.

13.12 Experimentos Conductuales

Se realizo una denervación dopaminérgica a diferentes grupos de ratas (descrita previamente en apartado 12.2), 8 días posteriores a la lesión se evaluó la conducta de giro ipsilateral inducida por anfetamina (8 mg/kg i.p.). 8 días después, se realiza otra cirugía estereotáxica a las mismas ratas, en la cual, se les implanta una cánula guía de 2 cm de longitud en la SNr del hemisferio previamente denervado con 6-OHDA.

La cánula se fijó al cráneo con tornillos de acero inoxidable y acrílico dental con las siguientes coordenadas: Anterior=9.5, Lateral= -2.2, Ventral= -7.3 mm con un ángulo de 22° (ver figura 31) con respecto a la línea media de acuerdo con el Atlas de Paxinos (1997). Las ratas se dejaron recuperar durante 7 días, al día 8, las ratas fueron administradas con los antagonistas reversibles del receptor D1 (SCH 23390: 3 mg/kg i.p.) o para los receptores D2/D3 (Sulpiride: 200 mg/kg i.p.) y su combinación con la finalidad de proteger dichos receptores de su subsecuente antagonismo con el antagonista irreversible de todos los receptores dopaminérgicos, Tipo-D1 y Tipo-D2, EEDQ (6 mg/kg i.p.) administrado 60 minutos después de la administración de los antagonistas reversibles (Meller E. et al., 1985 y Hemsley M.K. et al., 1998). 24 horas después, se les administro a las ratas a través de un inyector de 2.2 cm de longitud unido a una jeringa Hamilton los agonistas selectivos para los receptores D1 (SKF 38393: 10µg/µl), D3 (PD 128, 907: 1µg/µl) así como su combinación, solos o en presencia de NEM; inhibidor de la vía de señalización de las proteínas Gi (2 µg/µl), administrado 20 minutos antes de la administración de los agonistas. Se evaluó la conducta de giro contralateral en dichas condiciones durante sesiones de 60 minutos (figura 23).

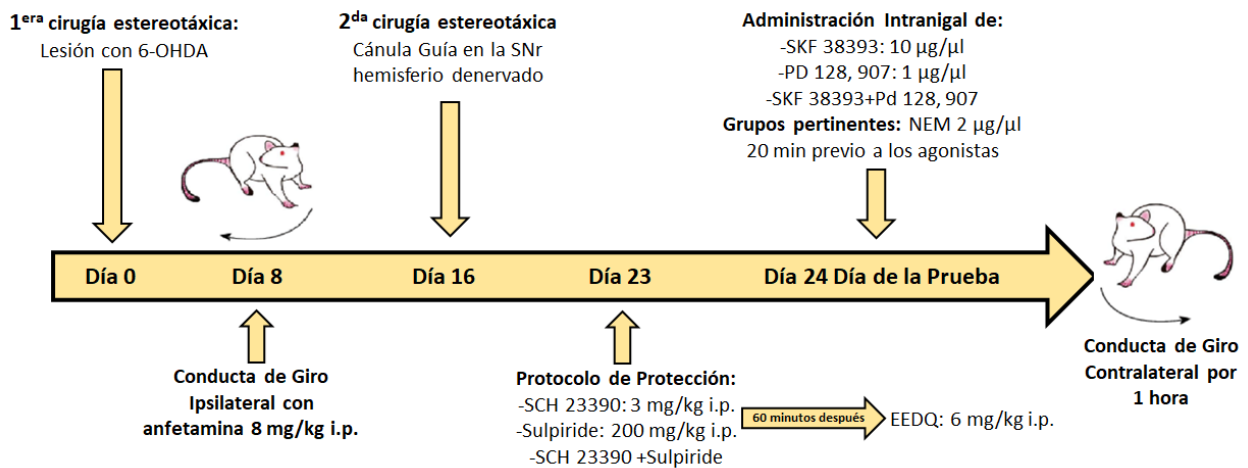


Fig. 23. Línea temporal con las maniobras y estrategias farmacológicas utilizadas. Los números dentro de la flecha de tiempo indican el número de días después de la lesión 6-OHDA.

13.13 Análisis Estadístico

Todos los datos se analizaron usando el software Graph Pad, San Diego, CA, USA. Excepto donde se indique, se usó ANOVA de 1 vía combinado con una prueba de Tukey para comparar diferencias entre los diferentes grupos experimentales y pruebas de T-student no pareado para realizar comparaciones entre 2 grupos.

13.14 Fármacos

Adenosina 5'-trifosfato disódico hidrato de sal (ATP); Hemihidrocloruro de O-(carboximetil) hidroxilamina (ácido aminooxiacético); Clorhidrato de DL-anfetamina; (+) - Clorhidrato de butaclamol; 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ); 7 β -acetoxi-8,13-epoxi-1 α , 6 β , 9 α -trihidroxi-14-en-11-one, (forskolina); 4'-acetil-N-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil] butil - [1,1'-bifenil]-4-carboxamida (GR 103,691); Ácido (S)-5-isoquinolinesulfónico 4-[2-[(5-isoquinolinilsulfonil) metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil) propil] fenil éster, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina (KN-62); Clorhidrato de 2,4,5-trihidroxi-fenetilamina, clorhidrato de 2,5-dihidroxitiramina, clorhidrato de 2-(2,4,5-trihidroxi-fenil) etilamina, (6-OHDA); N-etilmaleimida (NEM); Ácido Nipecóico; Clorhidrato de (+)-(4aR, 10bR)-3,4,4a, 10b-tetrahydro-4-propil-2H, 5H-[1] benzopirano [4,3-b]-1,4-oxazin-9-ol (PD 128,907); R(-) - clorhidrato de 7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepina (SCH 23390); (RS)-2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihidroxi-1-fenil-1H-3-epina clorhidrato (SKF 38393), adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Radioactivos. [^3H]-GABA (94 Ci/mmol); [^3H]-Adenina (27.2 Ci/mmol) y [^3H] R(+)-7-hidroxi DPAT, (10 Ci/mmol) de Perkin Elmer.

Anticuerpos. Los anticuerpos policlonales para D3R y D3nf se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. Numero de catálogo: D3DR (H-50): sc-9114 y D3NF (C-16): sc-9184.

14. RESULTADOS

14.1 La denervación con 6-OHDA disminuye los niveles de expresión de RNAm y proteína de la isoforma D3nf sin cambios de expresión en el receptor D3.

Como se ha descrito en reportes previos, la isoforma D3nf es sensible a cambios en el tono dopaminérgico, incrementando su expresión en tonos hiperdopaminérgicos (Schmauss C. 1996) y disminuyendo su expresión en tonos hipo dopaminérgicos (Prieto G.A. et al., 2011). Nosotros evaluamos los cambios de expresión del receptor D3 y su isoforma D3nf a nivel del RNAm en homogenados de estriado por medio de qRT-PCR y a nivel de proteína por medio de experimentos de Western Blot en estriado y sinaptosomas de la SNr de ratas con denervación dopaminérgica. Los resultados de la qRT-PCR se utilizó el Hprt 1 como control interno; gen constitutivo que no modifica su expresión en la denervación dopaminérgica (Avalos-Fuentes A. et al., 2015).

Los resultados en los cambios de expresión del RNAm se ilustran en la fig. 24. el hemisferio no lesionado se utilizó como control. Se aprecia una regulación a la baja del RNAm de la isoforma D3nf en el hemisferio lesionado sin alteraciones significativas en los niveles de expresión del RNAm del D3R (Expresión relativa del RNAm del D3R, Control=1 vs. Denervado= 1.04 ± 0.03 , $t = 1.08$, $df=6$, $p = 0.32$, $n = 4$; Expresión relativa del RNAm de la isoforma D3nf, Control=1 vs. Denervado= 0.54 ± 0.05 , $t = 8.64$, $df=6$, $p < 0.001$, $n = 4$, t de student no pareada).

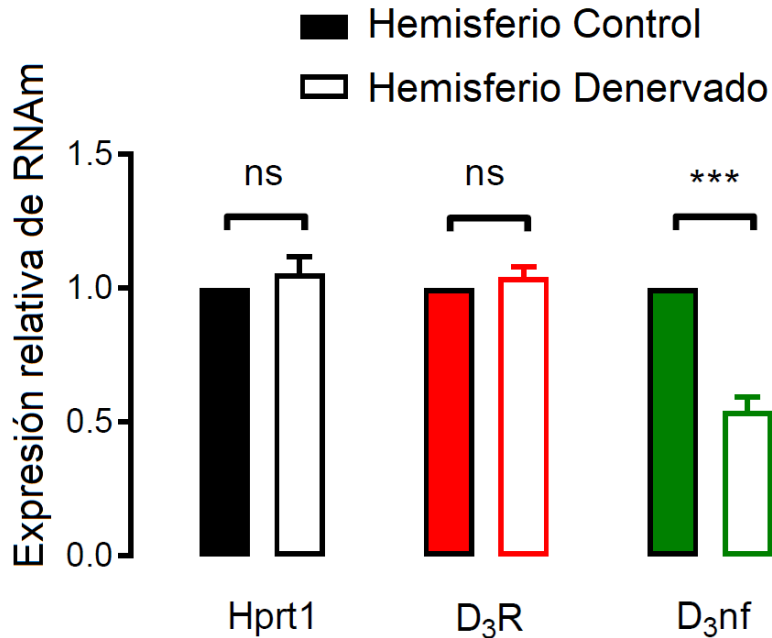


Fig. 24. La denervación dopaminérgica disminuye la expresión del RNAm de la isoforma D3nf sin alterar el RNAm del D3R. Resultados de qRT-PCR TaqMan realizado en estriado de ratas con denervación dopaminérgica, muestra una regulación a la baja de la isoforma D3nf en el estriado denervado con 6-OHDA vs. estriado control. El receptor D3 no se modificó significativamente. La expresión del Hprt1 se utilizó como control interno. Los resultados están expresados como una relación del hemisferio denervado con respecto al hemisferio control. *** $p < 0.001$ comparado con su control. T de student. Los valores son la media \pm S.E.M de 3 experimentos con 4 animales.

Por otro lado, utilizamos Western Blot para evaluar los cambios en la expresión proteica del D3R y su isoforma D3nf. En la fig. 25. se aprecia una regulación a la baja en los niveles de expresión proteica de la isoforma D3nf en el hemisferio denervado con 6-OHDA tanto en estriado como en SNr. En A, el panel superior es un blot representativo de 4 experimentos de Western blot de D3R en SNr y en estriado separados por una línea en la cual se utilizó homogenados de ojo de rata como control negativo (Fujieda et al., 2003 y Prieto et al., 2011).

Se detectaron 2 bandas para el D3R una banda alrededor de los 75 KDa y otra banda menos marcada pero detectable aproximadamente a los 40 KDa, las cuales corresponden a bandas previamente reportadas en el estriado ventral usando el mismo anticuerpo (Ikeda E. et al., 2013).

La grafica inferior es el análisis densitométrico, como se puede observar, no existen diferencias significativas entre los hemisferios denervado y control en ninguno de los 2 núcleos analizados ni en ambas bandas detectadas (porcentaje de cambio para la SNr: banda de 75 KDa, hemisferio denervado= $109\pm 9\%$ vs. hemisferio control= 100%, $t= 0.99$, $df= 6$, $p= 0.36$. Banda de 40 Kda, hemisferio denervado= $83\pm 12\%$ vs. hemisferio control= 100%, $t= 1.34$, $df= 6$, $p= 0.23$, $n= 4$. Porcentaje de cambio para el estriado: banda de 75 KDa, hemisferio denervado= $102\pm 6\%$ vs. hemisferio control= 100%, $t= 0.34$, $df= 6$, $p= 0.75$. Banda de 40 Kda, hemisferio denervado= $92\pm 13\%$ vs. hemisferio control= 100%, $t= 0.654$, $df= 6$, $p= 0.53$, $n= 4$, t de student no pareada).

En B, el mismo formato para la isoforma D3nf, el panel superior es un blot representativo de 4 experimentos y la gráfica inferior es el análisis densitométrico. En cuanto a la isoforma D3nf se obtiene una banda de aproximadamente 68 KDa previamente reportada por Prieto G.A. et al., 2011 con el mismo anticuerpo.

A diferencia del D3R, pero en concordancia por el RNAm, se obtiene una disminución en los niveles de expresión proteica de la isoforma D3nf en el hemisferio denervado con respecto al hemisferio control en ambos núcleos analizados; SNr y estriado (porcentaje de cambio para la SNr: hemisferio denervado= $66\pm 3\%$ vs. hemisferio control= 100%, $t= 11.75$, $df= 6$, $p < 0.001$, $n= 4$. Porcentaje de cambio para el estriado: hemisferio denervado= $79\pm 1.5\%$ vs. hemisferio control= 100%, $t= 13.85$, $df= 6$, $p < 0.001$, $n= 4$. T de student no pareada).

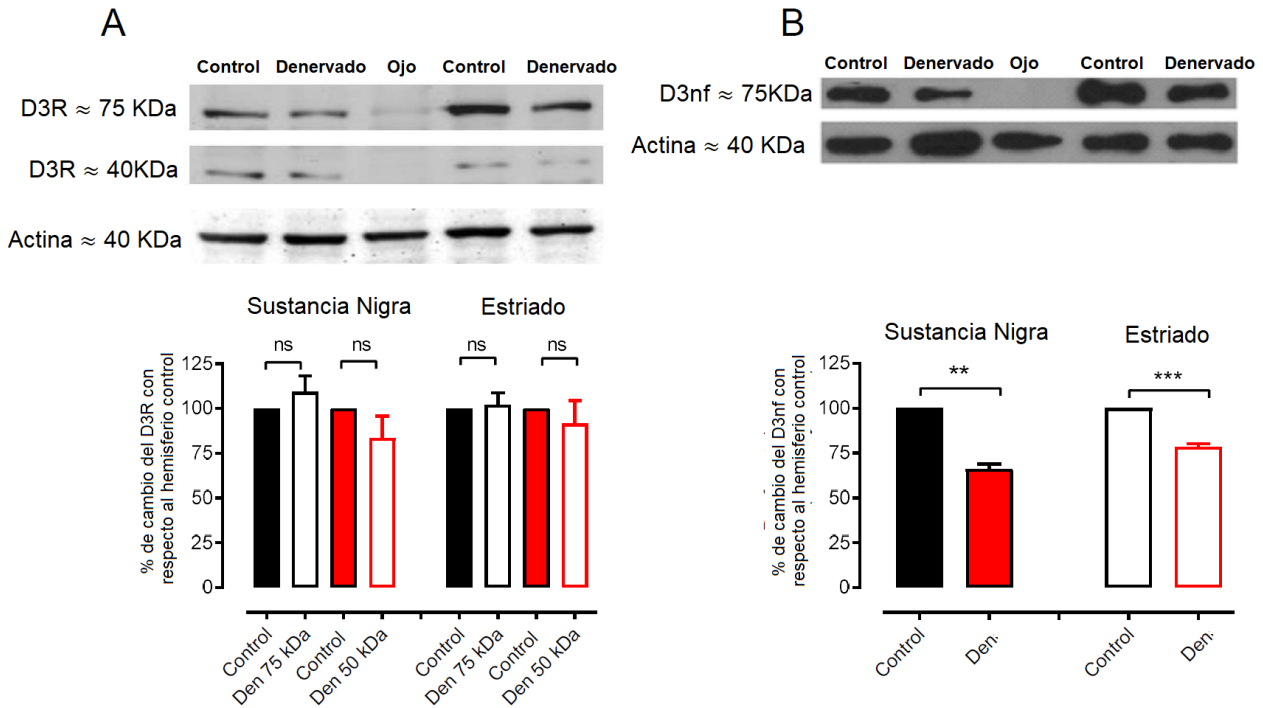


Fig. 25. La denervación dopaminérgica disminuye los niveles de expresión de la isoforma D3nf sin alterar la expresión del D3R en SNr y en estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. A, imagen superior, Western blot representativo del D3R del hemisferio control y denervado de sinaptosomas de la SNr y homogenados de estriado separados por una línea con homogenados de ojo de rata como control negativo, se detectaron 2 bandas, una de ≈ 75 KDa y otra de ≈ 40 KDa, en la imagen inferior se muestra el análisis densitométrico. B, se presenta lo mismo que en A pero con la isoforma D3nf, en el cual se observa una disminución en los niveles de expresión en el hemisferio denervado con respecto al control en ambos núcleos analizados, SNr y estriado. Los resultados están expresados como el porcentaje de cambio del hemisferio denervado con respecto al hemisferio control. ns, no significativo, diferencias entre grupos, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ con respecto al hemisferio control, t de student. Los valores son la media \pm S.E.M de 4 experimentos con proteína de 20 animales para los sinaptosomas de la SNr y 6 animales para el estriado.

14.2 La denervación incrementa la densidad de receptores D3 en la membrana.

Con la finalidad de comprobar si una disminución en la expresión de la isoforma D3nf correlaciona con incrementos en D3R membranales capaces de ligar agonista, realizamos estudios de saturación de unión a radio ligando con el agonista preferencial del D3R el [³H]-7-OH-DPAT (Levesque D. et al., 1992), en la figura 26 A se muestra una curva de saturación representativa de 3 experimentos de saturación. Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la unión máxima (B_{max}) en el hemisferio denervado comparado con el hemisferio control (Fig 26 B; B_{max} del hemisferio control= 202 ± 9 vs. hemisferio denervado= 277 ± 12 fmol/mg de proteína, $p=0.008$, $t=4.88$, $df=4$, t de student no pareada). No se observaron cambios significativos en la afinidad (K_d), figura 26 C (K_d hemisferio control= 3.5 ± 0.8 vs. hemisferio denervado= 3.3 ± 0.6 nM, $p=0.837$, $t=0.22$, $df=4$, t de student no pareada).

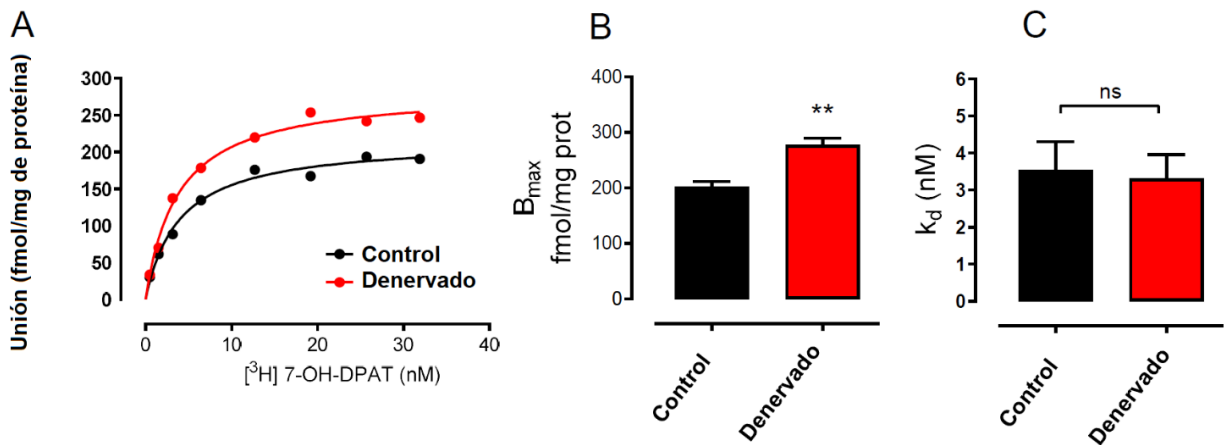


Fig. 26. La denervación dopaminérgica incrementa los D3R en membranas estriatales. A, curva de saturación representativa de unión de radio ligando al D3R con [³H]-7-OH-DPAT en membranas estriatales de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, se compara el hemisferio control vs. el hemisferio denervado. B, resumen de los efectos sobre la B_{max} , y C, sobre la K_d de 3 experimentos, 3 réplicas por experimento. ns, no diferencias significativas entre los grupos y $p < 0.01$, t de student.

14.3 La denervación dopaminérgica no modifica la interacción D1R-D3R, pero disminuye la dimerización D3R-D3nf.

Como ya se evidencio previamente, el heterodímero D1R-D3R está presente y es funcional a nivel de la SNr (Cruz-Trujillo R. et al., 2013, ver Fig. 7), y dicha interacción dimérica se mantiene tras la denervación dopaminérgica con 6-OHDA (Loya-Lopez S. Tesis de maestría 2012. Ver Fig. 13). Por otro lado, la isoforma D3nf regula negativamente la funcionalidad del D3R por dimerización (Elmhurst J.L. et al., 2000), por lo tanto, nosotros estudiamos si tras la denervación dopaminérgica se produce una disminución en la interacción D3R-D3nf. Realizamos experimentos de ensayo de proximidad de ligando (PLA; considerada prueba de heterodimerización en tejido nativo) en rebanadas de estriado y de SNr de ratas denervadas unilateralmente con 6-OHDA y se comparó la expresión de los puntos positivos a PLA entre los hemisferios denervado y control.

En la figura 27A se observa la marca roja positiva de PLA para la interacción D3R-D3nf obtenida del estriado dorsal, en 27B una marca positiva, pero de menor densidad es observada para el hemisferio denervado, 27E y 27F son magnificaciones de las imágenes superiores. La marca en azul corresponde a los núcleos marcados con DAPI en todas las imágenes. En la figura 27I, es el análisis de los puntos rojos positivos a PLA, es posible observar una disminución de aproximadamente 60% en el hemisferio denervado con respecto al hemisferio control (Puntos de PLA por sección, hemisferio control 154 ± 22 vs. 59 ± 7 hemisferio denervado, diferencia significativa 95, $p = 0.0006$, $t = 4.09$, $df = 10$, t de student no pareada) En negativo se indica un control en la ausencia de anticuerpos primarios.

En las figuras 27C, D, G y H, se ilustra los mismos parámetros, pero evaluados en secciones de la SNr. En este caso la cantidad de puntos positivos a PLA es menor con respecto al estriado dorsal pero detectables; además, se observó una disminución similar en el hemisferio denervado (figuras 27D y H).

El análisis densitométrico confirmó una disminución de $\approx 60\%$ en el hemisferio denervado con respecto al hemisferio control, (Puntos de PLA por sección, hemisferio control = 69 ± 12 vs. 27 ± 5 en el hemisferio denervado, diferencia significativa 42, $p = 0.005$, $t = 3.12$, $df = 10$, t de student no pareada).

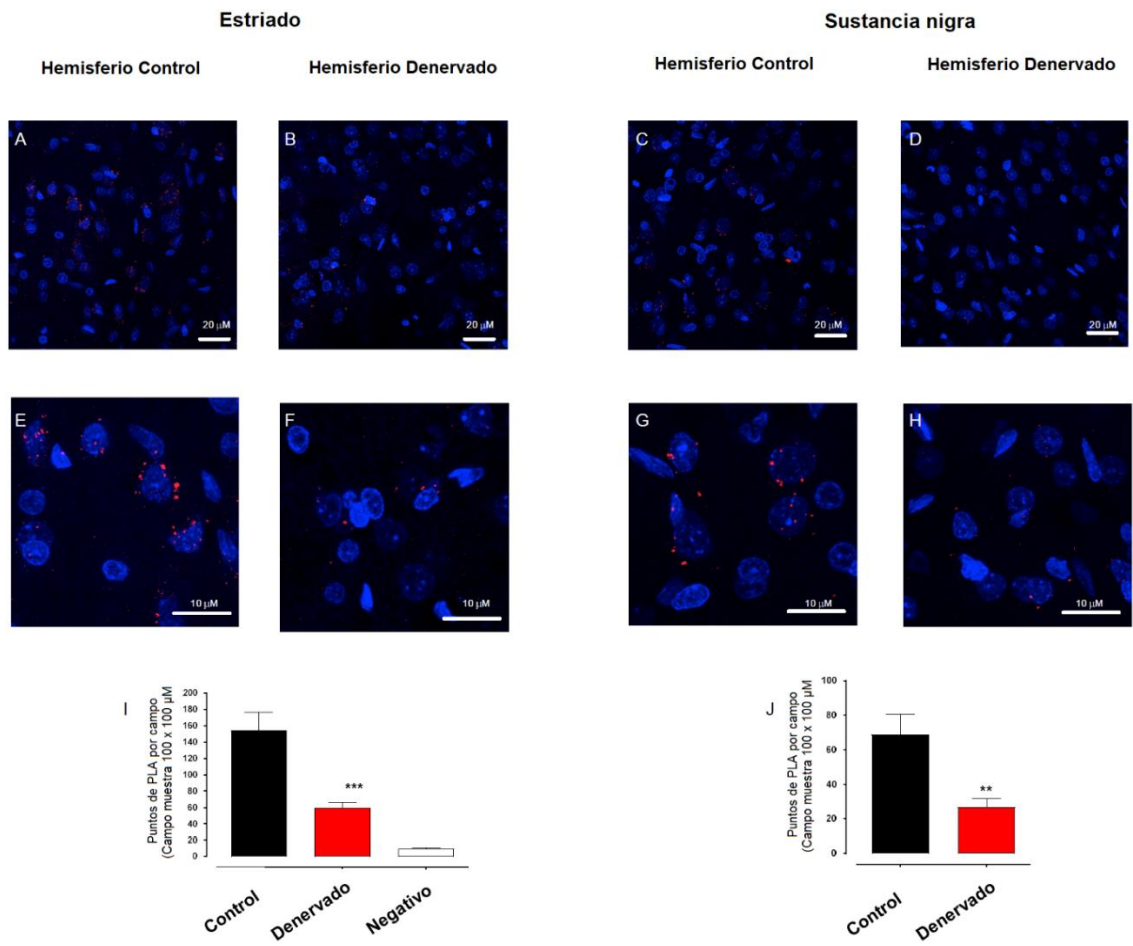


Fig. 27. La interacción física entre el D3R y su isoforma D3nf en estriado y en SNr disminuye en la denervación, evaluado por medio de ensayo de proximidad de ligando (PLA). En A y C se muestra una imagen típica de PLA del estriado dorsal y de la SNr respectivamente en el hemisferio control y el hemisferio denervado B y D de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA. E-H se muestran sus ampliificaciones. En la gráfica de barras de I y J se muestra el conteo de puntos positivos a PLA de 12 diferentes campos de 3 ratas denervadas comparando el hemisferio control vs. el hemisferio denervado. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ con respecto al hemisferio control, t de student no pareada.

14.4 El bloqueo de la señalización de proteínas Gi desenmascara la coexistencia de la señalización típica y atípica del D3R sobre la formación de AMPc.

Por los resultados en los cuales se evidencia que la interacción entre los receptores D1 y D3 (Coinmunoprecipitación) se mantiene tras la denervación e inversamente la dimerización D3R-D3nf disminuye (PLA) así como el incremento en la densidad de D3R membranales funcionales en estriado (Binding), nosotros evaluamos si el bloqueo de la funcionalidad de estos nuevos D3R desenmascara su señalización típica y atípica.

Bloqueamos la señalización de las proteínas Gi por medio de la administración de NEM (Shapiro M.S. et al., 1994) durante la activación del D3R y se realizaron experimentos de formación de AMPc en el hemisferio control, así como en el hemisferio denervado de estriado y de SNr; los resultados se muestran en la figura 28. Los paneles superiores ilustran los resultados en estriado, hemisferios control y denervado, en las columnas rellenas sin NEM y en las columnas vacías en presencia de NEM (28A y 28C, 28B y 28D respectivamente), en los paneles inferiores los mismos experimentos, pero realizados en la SNr (28E y 28F, 28G y 28H respectivamente).

En el hemisferio control de ambos núcleos (figuras 28^a y 28E) se muestra la señalización “atípica” del D3R como se ha reportado previamente y en una magnitud similar (Avalos-Fuentes A. et al., 2015), potenciando la respuesta estimuladora de la activación del D1R sobre la formación de AMPc (Estriado: figura 28A. formación de AMPc SKF 38393 $126 \pm 2\%$ vs. SKF 38393+PD 128,907 $146 \pm 2\%$, diferencia significativa -19.67 , $p=0.004$, $n=3$, $F=127.4$, $df=6$. SNr: figura 28E. formación de AMPc SKF 38393 $130 \pm 3\%$ vs. SKF 38393+PD 128,907 $153 \pm 6\%$, diferencia significativa -23 , $p=0.02$, $n=3$, $F=72.86$, $df=6$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey). La adición de NEM ($50 \mu\text{M}$) no modifico la respuesta al coactivar a los D3R y D1R en el hemisferio control (estriado figura 28B. formación de AMPc SKF 38393 $128 \pm 4\%$ vs. SKF 38393+PD 128,907 $152 \pm 4\%$, diferencia significativa -24 , $p=0.014$, $n=3$, $F=58.4$, $df=6$; SNr figura 28F. formación de AMPc SKF 38393 $133 \pm 7\%$ vs. SKF 38393+PD 128,907 $164 \pm 3\%$, diferencia significativa -31.67 , $p=0.02$, $n=3$, $F=52.38$, $df=6$. ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Tukey).

El NEM tampoco modifico la magnitud de la respuesta inducida por forskolina 10 μ M (control positivo), SKF 38393 y SKF 38393+PD 128,907 sobre la formación de AMPc cuando se comparó con su respectiva condición en los experimentos sin NEM en ambos, estriado y SNr (estriado: forskolina figura 28A 191 \pm 2.5% vs. figura 28B 185 \pm 7.6% p=0.50, ns, t=0.75, df=4, n=3; SKF 38393 figura 28A 126 \pm 2% vs. figura 28B 128 \pm 4% p=0.68, ns, t=0.44, df=4, n=3; SKF 38393+PD 128,907 figura 28A 146 \pm 2% vs. figura 28B 152 \pm 4% p=0.21, ns, t=1.49, df=4, n=3. SNr: forskolina figura 28E 194 \pm 7% vs. figura 28F 208 \pm 9% p=0.26, ns, t=1.29, df=4, n=3; SKF 38393 figura 28E 130 \pm 3% vs. figura 28F 133 \pm 7% p=0.71, ns, t=0.38, df=4, n=3; SKF 38393+PD 128,907 figura 28E 153 \pm 6% vs. figura 28F 164 \pm 3% p=0.15, ns, t=1.77, df=4, n=3; t de student no pareada).

El efecto del bloqueo de la señalización de las proteínas Gi sobre los efectos del D3R y la estimulación del D1R sobre la formación de AMPc se evaluó también en el hemisferio denervado de ratas lesionadas con 6-OHDA tanto en estriado como en SNr. En el hemisferio denervado que no se trató con NEM, la activación del D3R previene los efectos estimulatorios del D1R sobre la formación de AMPc como se ha descrito previamente (Avalos-Fuentes A. et al., 2015) (Estriado: figura 28C: formación de AMPc SKF 38393 146 \pm 2% vs. SKF 38393+PD 128,907 99 \pm 3%, diferencia significativa 47, p<0.001, n=3, F=139, df=6. SNr figura 28G formación de AMPc SKF 38393 150 \pm 4% vs. SKF 38393+PD 128,907 99 \pm 8%, diferencia significativa 51, p<0.001, n=3, F=118, df=6. ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de Tukey).

Por el contrario, en el hemisferio denervado tratado con NEM, la activación del D3R ejerce su potenciación “atípica” sobre la formación de AMPc estimulado por la activación del receptor D1 en ambos, estriado y SNr (Estriado: figura 28D formación de AMPc SKF 38393 147 \pm 7% vs. SKF 38393+PD 128,907 180 \pm 2%, diferencia significativa -33, p=0.005, n=3, F=69.32, df=6. SNr figura 28H formación de AMPc SKF 38393 154 \pm 3% vs. SKF 38393+PD 128,907 183 \pm 2%, diferencia significativa -28.67, p=0.01, n=3, F=100, df=6. ANOVA 1 vía seguida de una prueba de Tukey).

Además, el análisis estadístico muestra que el NEM no modifica el efecto de la forskolina (control positivo), ni los efectos del SKF 38393 en el hemisferio denervado de manera similar como ocurre en el hemisferio control (estriado figura 28C formación de AMPc forskolina $213 \pm 7\%$ vs. figura 28D forskolina $207 \pm 7\%$ $p=0.55$, ns, $t=0.64$, $df=4$, $n=3$; SNr, figura 28G forskolina $228 \pm 3\%$ vs. figura 28H forskolina $225 \pm 5\%$ $p=0.85$, ns, $t=0.19$, $df=4$, $n=3$; estriado figura 28C formación de AMPc SKF 38393 $146 \pm 2\%$ vs. figura 28D SKF 38393 $147 \pm 7\%$ $p=0.85$, ns, $t=0.19$, $df=4$, $n=3$; SNr figura 28G formación de AMPc SKF 38393 $150 \pm 4\%$ vs. figura 28H SKF 38393 $154 \pm 3\%$ $p=0.45$, ns, $t=0.83$, $df=4$, $n=3$, todos analizados por t de student no pareada).

Es importante recalcar que los efectos de la activación del adenilato ciclasa por la forskolina y del D1R con el SKF 38393 son mayores en el hemisferio denervado que en el control, como mostro previamente (Rangel-Barajas et al., 2011) (estriado: figura 28A forskolina hemisferio control sin NEM $191 \pm 2\%$ vs figura 28C hemisferio denervado sin NEM 213 ± 7 , $t=2.90$, $df=4$, $p=0.04$; figura 28A SKF 38393 hemisferio control sin NEM $126 \pm 2\%$ vs figura 28C hemisferio denervado sin NEM 146 ± 2 , $t=7.034$, $df=4$, $p=0.002$. SNr figura 28E forskolina 38393 hemisferio control sin NEM $194 \pm 7\%$ vs figura 28G hemisferio denervado sin NEM 225 ± 5 , $t=3.57$, $df=4$, $p=0.02$; figura 28A SKF 38393 hemisferio control sin NEM $130 \pm 3\%$ vs figura 28C hemisferio denervado sin NEM 150 ± 4 , $t=4.09$, $df=4$, $p=0.015$, t de student no pareada).

En el mismo sentido, en los experimentos de tratamiento con NEM los efectos de la activación del adenilato ciclasa por la forskolina y el D1R con el SKF 38393 son mayores en el hemisferio denervado que en el hemisferio control (estriado: figura 28B forskolina hemisferio control tratado con NEM $185 \pm 8\%$ vs figura 28D hemisferio denervado tratado con NEM $207 \pm 7\%$, $t=2.17$, $df=4$, $p=0.05$; figura 28B SKF 38393 hemisferio control tratado con NEM $128 \pm 4\%$ vs figura 28C hemisferio denervado tratado con NEM 147 ± 7 , $t=2.39$, $df=4$, $p=0.04$. SNr figura 28E forskolina hemisferio control tratado con NEM $208 \pm 9\%$ vs figura 28G hemisferio denervado tratado con NEM 228 ± 3 , $t=2.66$, $df=4$, $p=0.03$; figura 28A SKF 38393 hemisferio control tratado con NEM $132 \pm 7\%$ vs figura 28C 28G hemisferio denervado tratado con NEM 154 ± 3 , $t=4.22$, $df=4$, $p=0.013$, t de student no pareada).

En estos experimentos, el antagonismo del D3R con GR 103,691 (10 nM) previno la potenciación, así como los efectos del D1R sobre la formación de AMPc mientras que no modifica la formación de AMPc por sí mismo.

Finalmente, la recuperación de la potenciación ejercida por el D3R sobre el D1R en la formación de AMPc después del tratamiento con NEM en el hemisferio denervado es mucho mayor que el hemisferio control tratado o no tratado con NEM (estriado figura 28A SKF 38393+PD 128,907 $146 \pm 2\%$ vs. figura 28D SKF 38393+PD 128,907 tratado con NEM $180 \pm 2\%$ $t=12.88$, $df=4$, $p<0.001$; estriado figura 28B diferencia significativa SKF 38393+PD 128,907 $152 \pm 4\%$ vs. figura 28D SKF 38393+PD 128,907 tratado con NEM $180 \pm 2\%$ $t=6.88$, $df=4$, $p<0.002$, $n=3$, t de student no pareada; SNr: figura 28E diferencia significativa SKF 38393+PD 128,907 $153 \pm 6\%$ vs. figura 28H SKF 38393+PD 128,907 tratado con NEM $183 \pm 2\%$ $t=4.79$, $df=4$, $p=0.008$; figura 28F diferencia significativa SKF 38393+PD 128,907 $164 \pm 3\%$ vs. figura 28D SKF 38393+PD 128,907 tratado con NEM $183 \pm 2\%$ $t=4.6$, $df=4$, $p<0.01$, $n=3$ t de student no pareada).

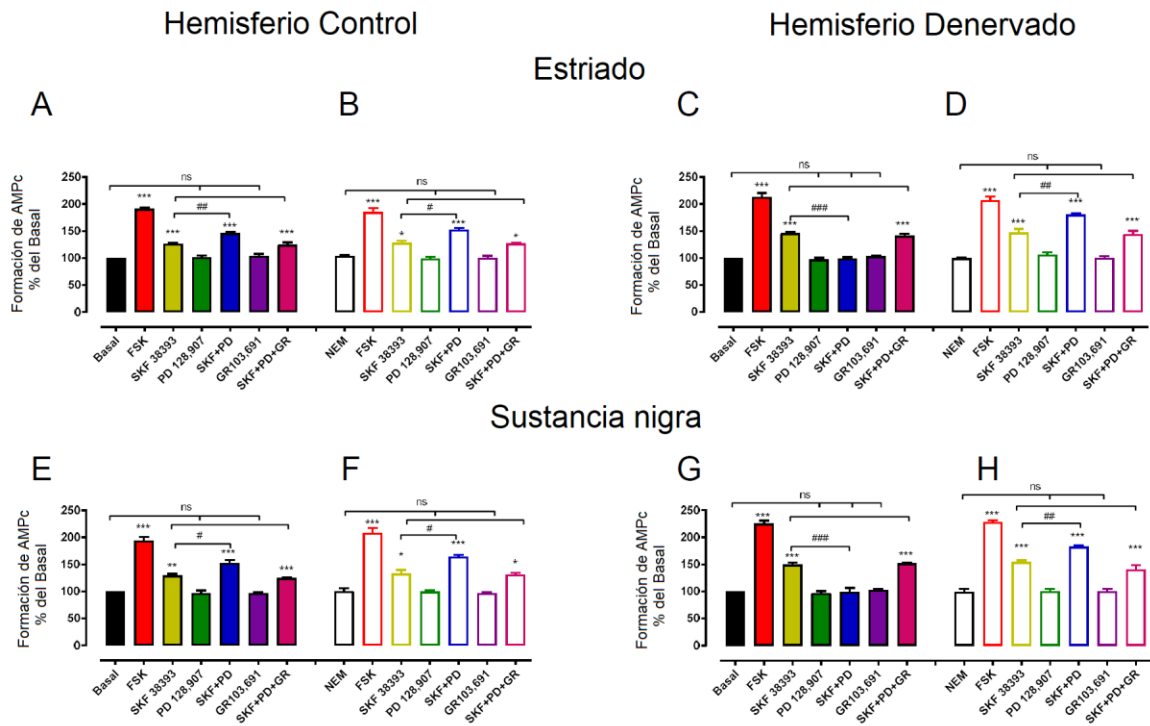


Fig. 28. El tratamiento con NEM desenmascara los efectos estimulatorios del D3R sobre el D1R en la formación de $[^3\text{H}]$ AMPc en el hemisferio denervado de rebanadas de estriado y de SNr de ratas lesionadas con 6-OHDA. A y E, ilustra la formación de $[^3\text{H}]$ AMPc estimulado por el agonista SKF 38393 (1 μM) en rebanadas de estriado y de SNr respectivamente, del hemisferio control y en el hemisferio denervado, el efecto del agonista selectivo del D3R (100 nM) y el antagonista selectivo del D3R GR 103,691 (10nM) solo o en combinación. La forskolina (10 μM) se uso como control positivo de actividad del adenilato ciclasa. En B y F se evaluaron los mismos parámetros, pero en presencia de NEM (50 μM) para el bloqueo de la señalización de las proteínas Gi. C y G son los mismos experimentos que A y E, D y H son los mismos experimentos que B y F pero en el hemisferio denervado. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ con respecto a la condición control. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$, y ns no diferencia significativa entre grupos. ANOVA de 1 vía seguida de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. $n = 5$ experimentos, 3 réplicas por cada experimento.

14.5 Efecto del NEM sobre la activación del D3R en liberación de [³H]-GABA durante la denervación.

En terminales estriatonigrales, así como en recurrentes colaterales, cambios en AMPc se traducen en incrementos en la liberación de GABA (Nava-Asbell . et al., 2001; Arias-Montaña J.A. et al., 2007). Por lo tanto, estudiamos si la recuperación de la señalización “atípica” del D3R desenmascarada por el tratamiento con NEM en la formación de AMPc, también desenmascara la potenciación del D3R estimulada por la activación del D1R en la liberación de GABA en rebanadas de la SNr.

Los resultados de los experimentos de liberación de GABA se ilustran en la figura 29. En el panel superior el hemisferio control y en el panel inferior el hemisferio denervado. En A y C se muestra el curso temporal de los experimentos de liberación de GABA con las condiciones experimentales típicas. En B y D se muestra el área relativa para cada condición experimental expresada como porcentaje del control de 5 experimentos.

Se puede observar que en el hemisferio control (B) la activación del D3R con PD 128, 907 no modifica la liberación de GABA estimulada por la activación del D1R con SKF 38393 (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 176±6% vs SKF 38393+PD 128,907 171±10%, diferencia significativa 4.75, p=0.97, n=5, F=57.62, df=5. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey), es importante considerar que en condiciones de despolarización inducidas con K⁺ en los experimentos de liberación de GABA, la proteína cinasa dependiente de Calcio/Calmodulina II (CaMK II) bloquea la actividad del D3R (Avalos-Fuentes et al., 2013), por lo tanto, incluimos una condición experimental en presencia del KN-92 un bloqueador de la CaMK II (Tokumitsu H. et al., 1990). Bajo estas condiciones, la activación del D3R potencia los efectos estimulatorios de la activación del D1R sobre la liberación de GABA (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 176±6% vs SKF 38393+PD 128,907+ KN-62 204±6%, diferencia significativa -28, p=0.03, n=5, F=57.62, df=5. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

Similarmente, en las condiciones de tratamiento con NEM, la activación del D3R no modifica los efectos de la activación del D1R (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 169±10% vs SKF 38393+PD 128,907+NEM 162±6%, diferencia significativa 6.78, $p=0.92$, $n=5$, $F=49.06$, $df=5$. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey) hasta que las rebanadas fueron tratadas con KN-62 (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 169±10% vs SKF 38393+PD 128,907+NEM 201±6%, diferencia significativa -32.22, $p=0.01$, $n=5$, $F=49.06$, $df=5$. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

En el hemisferio denervado (D), en la condición donde no se trató con NEM, se puede observar el efecto antagónico del D3R con PD 128, 907 sobre la estimulación de liberación de GABA inducida por la activación del D1R con SKF 38393 (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 196±7% vs SKF 38393+PD 128,907 100±3%, diferencia significativa 96, $p<0.001$, $n=4$, $F=78.85$, $df=5$. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey), la adición del bloqueador de la CAMK II no modifico este efecto como se describió previamente (Avalos-Fuentes et al., 2015) (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 196±3% vs SKF 38393+PD 128,907+ KN62 102±2%, diferencia significativa 94, $p<0.001$, $n=4$, $F=78.85$, $df=5$. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

Como ocurre en los ensayos de formación de AMPc en el hemisferio denervado tratado con NEM, el D3R potencia los efectos estimulatorios de la activación del D1R sobre la liberación de GABA (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 204±2% vs SKF 38393+PD 128,907 308±26%, diferencia significativa -104, $p=0.001$, $n=4$, $F=78.55$, $df=5$. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey). En esta condición, la inclusión del bloqueador de la CaMK II no modifica el efecto del D3R (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 204±2% vs SKF 38393+PD 128,907+NEM 303±6%, diferencia significativa -99, $p<0.001$, $n=4$, $F=78.55$, $df=4$. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

La estimulación de la liberación de GABA por el D1R es mayor en condiciones de denervación con o sin NEM con respecto al hemisferio control (Área relativa bajo la curva: SKF 38393 hemisferio control 176 ± 6 % vs. SKF38393 hemisferio denervado 196 ± 7 %, $t=2.23$, $df=8$, $p=0.03$, $n=5$ t de student no pareada y vs. SKF38393+NEM hemisferio denervado 204 ± 4 %, $t=3.80$, $df=8$, $p=0.002$, $n=5$ t de student no pareada).

Además, la potenciación del D3R sobre el D1R en la liberación de GABA observada en el hemisferio denervado después del tratamiento con NEM es mayor comparado con la potenciación con o sin NEM del hemisferio denervado (hemisferio denervado SKF 38393+PD 128,907+NEM 308 ± 26 % vs. hemisferio control SKF 38393+PD 128,907 204 ± 6 %, $t=3.94$, $df=8$, $p=0.004$, and vs. hemisferio control SKF 38393 + PD 128,907+NEM 201 ± 4 % $t=4.08$, $df=8$, $p=0.004$, $n=5$ cada grupo, t de student no pareada).

En estos experimentos el antagonismo del D1R con SCH 23390 (100 nM) previno la efecto antagónico o sinérgico del D3R sobre la activación del D1R en la liberación de GABA mientras que no modifica la liberación de GABA por sí mismo.

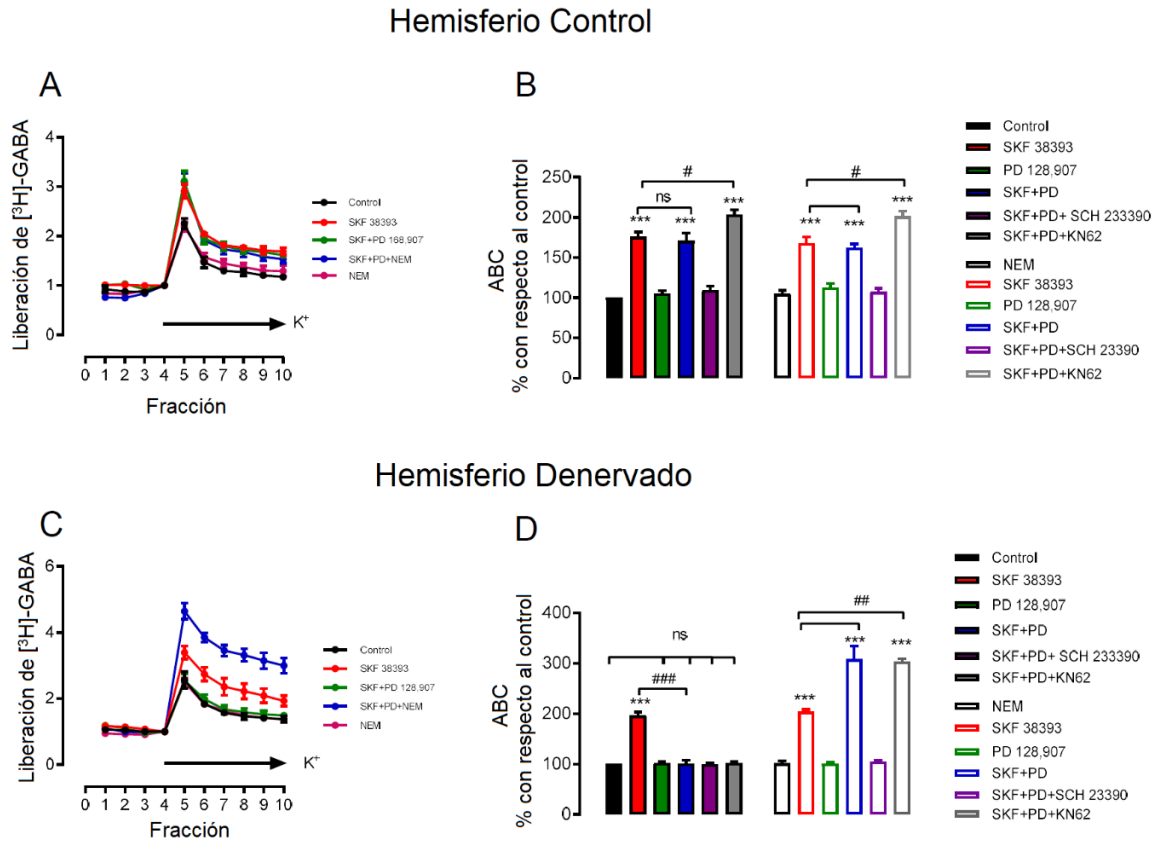


Fig. 29. El tratamiento con NEM desenmascara los efectos estimulatorios del D3R sobre la liberación de [³H]-GABA inducida por la activación del D1R en el hemisferio denervado de rebanadas de la SNr de ratas lesionadas con 6-OHDA. A y C curso temporal del experimento, en B y D se ilustra la liberación de [³H]-GABA estimulada por el agonista del D1R SKF 38393 (1 μ M) en rebanadas del hemisferio control de la SNr, columnas superiores rellenas (B) y en rebanadas del hemisferio denervado de la SNr, columnas inferiores rellenas (D). Así mismo, se muestra el efecto del agonista selectivo del D3R PD 128, 907 (100 nM) y el antagonista selectivo del D1R SCH 23390 (100 nM) solo o en combinación. El KN-62 (10 μ M) se utilizó para bloquear la actividad de la CaMK II. Columnas vacías en B y D, los mismos experimentos, pero en presencia de NEM (100 μ M) para bloquear la señalización de las proteínas Gi. ***p<0.001 con respecto a la condición control. ### p<0.001, #p<0.05 y ns, no diferencias significativas entre grupos. ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, n=5 experimentos, 3 réplicas por experimento.

14.6 La señalización típica y atípica participan en los efectos motores de la coactivación de los receptores D1 y D3.

Para estudiar si la señalización “típica” y “atípica” del D3R que modula la liberación de GABA en la SNr durante la denervación tiene impacto en la conducta motora, realizamos experimentos con inyecciones intranigrales de los agonistas selectivos del D1R y D3R directamente en la SNr del hemisferio denervado y medimos la conducta de giro contralateral generada. 24 horas previo al experimento, los animales se trataron con EEDQ (6 mg/kg i.p. (Hemsley M.K. et al., 1998)) con la finalidad de asegurar la activación de un tipo de receptor dopaminérgico y no la posible modificación por otro receptor. Utilizamos el protocolo de protección descrito por Hemsley M.K. et al., 1998; se administró el antagonista reversible del D1R SCH 23390 (3 mg/kg i.p.) y del D2R/D3R Sulpiride (200 mg/kg i.p.), 60 minutos después se administró el EEDQ i.p. de esta manera el antagonista irreversible EEDQ se unirá a todos los receptores dopaminérgicos disponibles excepto aquellos receptores que se protegieron con su antagonista reversible (D1R, D3R o su combinación), 24 horas después, los antagonistas reversibles he habrán excretado del organismo del animal dejando a los receptores protegidos disponibles para su activación y el resto de los receptores aún estarán antagonizados por el EEDQ y no podrán ser activados (ver fig. 23). Además, para prevenir la señalización del por medio de proteínas Gi del D3R, utilizamos NEM (2µg/1µl) inyectado directamente en la SNr 20 minutos previos a la administración de los agonistas (para el D1R= SKF 38393 10 µg/1µl, D3R= PD 128, 907 1 µg/1µl, o su combinación). En la figura 30A se ilustra el curso temporal de la conducta de giro contralateral generada por distintos tratamientos intranigrales en sesiones de 60 minutos.

La administración del agonista selectivo para el D1R SKF 38393 induce un significativo y marcado giro contralateral con respecto a la solución salina (barra roja rellena figura 30B, SKF 38393 467±35 giros vs. vehículo 23±6, diferencia significativa -433, $p < 0.001$, $F = 37.85$, $df = 7$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey). Por su parte, la activación del D3R con su agonista selectivo produce giro contralateral menos robusto pero significativo (barra azul rellena figura 30B, PD 128,907 228±36 giros vs. vehículo 23±6, diferencia significativa -205, $p = 0.005$, $F = 37.85$, $df = 7$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

La coadministración de PD 128, 907 con SKF 38393 previno los giros inducidos por el D1R, disminuyendo los giros generados a niveles similares a la administración del agonista D3R solo (barra verde rellena figura 30B con respecto a la barra roja rellena: SKF 38393 467±35 giros vs SKF 38393 + PD 128,907 204±26 giros, diferencia significativa 263, $p < 0.001$; figura 30B barra azul rellena con respecto a la barra verde rellena: SKF 38393 + PD 128,907 204±26 giros vs. PD 128,907 228±36 giros, diferencia significativa -25, ns; $F=37.85$, $df=7$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey). Por otro lado, cuando previamente se administró NEM intranigral, la activación del D3R potencia los giros inducidos por la activación del D1R (figura 30B barra verde vacía), comparada con la activación del D1R solo (figura 30B barra verde vacía vs. barra roja vacía, SKF 38393 409±42 giros vs SKF 38393+PD 128,907+NEM 691±26 giros, diferencia significativa -282, $p < 0.001$, $F=37.85$, $df=7$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

El NEM no modificó los efectos del SKF 38393 sobre los giros contralaterales (figura 30B barra roja rellena vs barra roja vacía, SKF 38393 467±35 giros vs. SKF 38393 + NEM 448±26 giros, diferencia significativa 18.67, ns $F=37.85$, $df=7$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey). Interesantemente, el NEM también previno los giros generados por la activación del D3R solo (figura 30B barra azul rellena vs. barra azul vacía: PD 128,907 228±36 giros vs. PD 128,907 +NEM 9 ±5 giros diferencia significativa 219, $p < 0.005$, $F=37.85$, $df=7$, ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de Tukey).

No se encontraron diferencias significativas en los efectos sobre la conducta de giro entre la solución salina y los vehículos para el SKF 38393, PD 128, 907 y el NEM. Para comprobar que los efectos de los fármacos administrados son por la administración de los fármacos directamente en la SNr, en la figura 30C se muestra una gráfica del efecto conductual del SKF 38393 en animales denervados en los cuales la punta del inyector estaba fuera de la SNr (ver fig. 31), como se puede observar la conducta de giro estimulada por el SKF 38393 administrado fuera de la SNr es errática y de mucho menor magnitud.

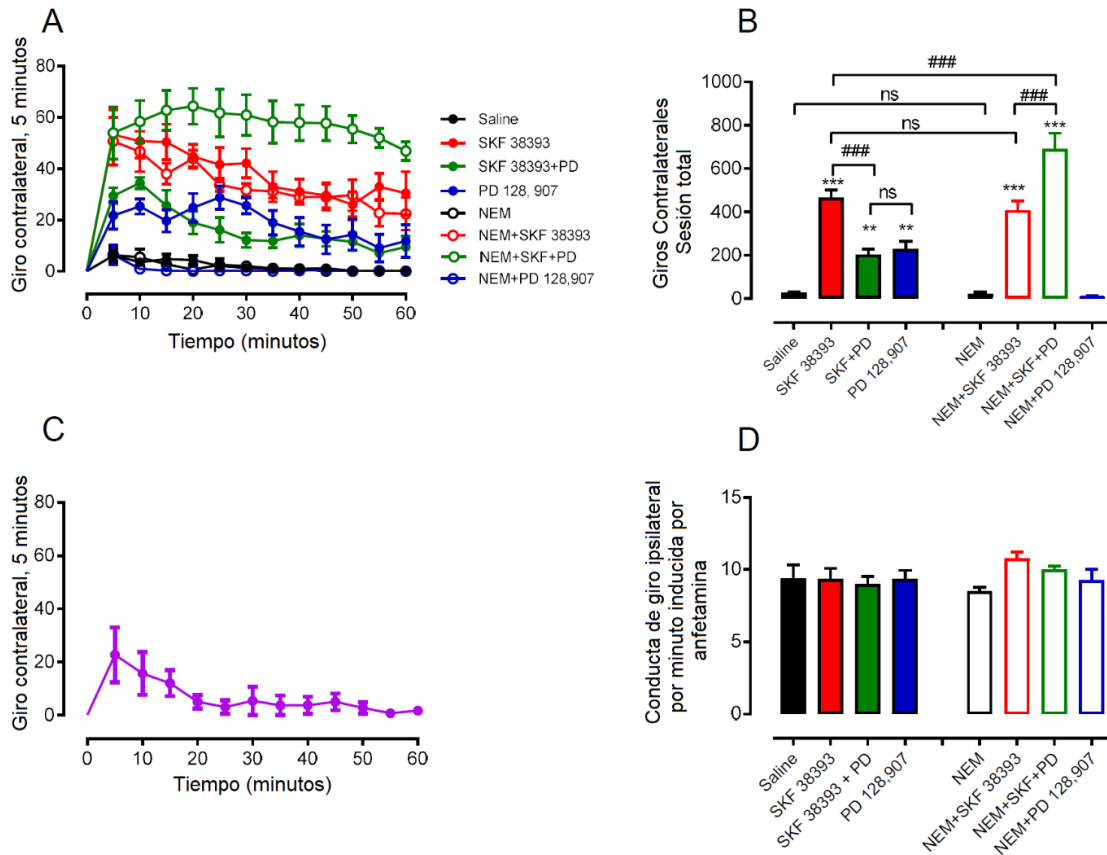


Fig. 30. Efecto conductual de la administración intranigral de los agonistas selectivos para los receptores D1 y D3 individual o su combinación en presencia de NEM se revelan los efecto antagónicos y sinérgicos de la interacción D1R-D3R en el hemisferio lesionado con 6-OHDA. En A, se observa el curso temporal del experimento registrado en giros contralaterales durante periodos de 5 minutos generados por microinyecciones de los agonistas selectivos para el D1R y/o D3R directamente en la SNr. En B, se ilustran los giros contralaterales totales durante los 60 minutos de duración del experimento inducidos por los diferentes tratamientos utilizados. Las barras rellenas son los experimentos en ausencia de NEM y las barras vacías son los experimentos en presencia de NEM administrado 20 minutos antes de los agonistas (SKF 38393= 10µg/µl, PD 128, 907= 1µg/µl y NEM= 2µg/µl). Todos los fármacos se administraron a una tasa de 1µl/minuto con un volumen total administrado de 1µl. En C, promedio de giros contralaterales inducidos con la inyección se SKF 38393 fuera de la SNr. En D, promedio de giro ipsilateral inducido por amfetamina por minuto de los grupos de animales en B, evaluados 8 días posteriores a la lesión con 6-OHDA y utilizado como criterio de selección del grado de denervación. Los datos son el promedio ± S.E.M de 4-6 ratas. **p<0.01. ***p<0.001 con respecto a salina o NEM; ### p<0.001 y ns, no diferencias significativas entre grupos. ANOVA de 1 vía seguido por una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Finalmente, para asegurar que todos los animales usados en los experimentos conductuales (administración intranigral) tienen el mismo grado de denervación dopaminérgica, en la figura 30D se muestra la conducta de giro ipsilateral inducida por amfetamina (8 mg/kg i.p.) 8 días posteriores a la lesión con 6-OHDA, como se puede observar no hay diferencias significativas en la conducta de giro entre los distintos grupos de animales utilizados.

En la figura 31 se muestra una microfotografía representativa del sitio de inyección en la SNr, así como una reconstrucción del sitio de inyección dentro de la SNr de los animales utilizados para los diferentes tratamientos.

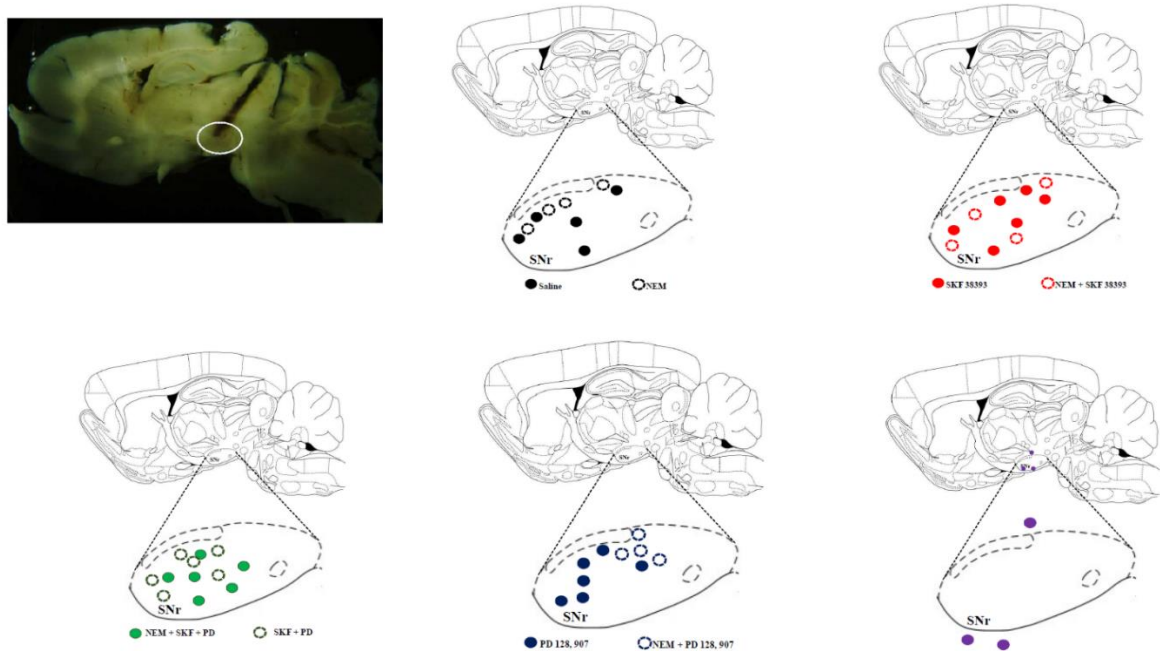


Fig. 31. Localización de la punta del inyector dentro de la sustancia nigra pars reticulata de los animales utilizados en los experimentos. En la esquina superior izquierda se muestra una microfotografía representativa de una rebana sagital donde se muestra la trayectoria de la cánula y la localización de la punta del inyector. Las imágenes de los diferentes grupos experimentales se obtuvieron de la superposición de las microfotografías con los diagramas esquemáticos del Atlas de Paxinos y Watson, la localización de la punta del inyector de los diferentes grupos se indica con color y nombre del fármaco que fue administrado intranigral.

15 DISCUSIÓN

Nuestros datos indican que el cambio de señalización del D3R de “atípica” a “típica” con respecto a los efectos estimulatorios de la activación del D1R sobre la formación de AMPc y liberación de GABA observado durante la denervación dopaminérgica en la SNr (Avalos-Fuentes A. et al., 2015) ocurre por la presencia de una nueva población de D3R. Estos presentan una señalización “típica” a través de proteínas Gi, que enmascara a la señalización “atípica” observada en condiciones control y también indica que ambas señalizaciones del D3R pueden coexistir durante la denervación dopaminérgica e impactar en la conducta motora. Estos hechos correlacionan con una disminución en la expresión de la isoforma D3nf y su interacción con el D3R, que asociado con un incremento de receptores D3 a nivel de la membrana plasmática puede explicar el aparente cambio en la señalización del D3R que se opone a los efectos estimulatorios del D1R o el heterodímero D1R-D3R.

15.1 Cambios en la expresión relativa del D3R y su isoforma D3nf durante condiciones control y condiciones de denervación dopaminérgica.

En condiciones normales, hay una expresión significativa de D3R que unen [³H]-7-OH-DPAT en membranas estriatales (fig. 26), dado que la activación con ligandos selectivos del D3R no modifica las corrientes de Ca²⁺, la formación de AMPc o la liberación de GABA en neuronas estriatales espinosas medianas (Prieto G.A. et al., 2011; Cruz-Trujillo R. et al., 2013; Avalos-Fuentes A. et al., 2013 y 2015) (figuras 28 y 29), es muy probable que todos estos D3R estén asociados a D1R formando heterodímeros con una funcionalidad “atípica” o sinérgica. Además, al parecer los heterodímeros D1R-D3R se ensamblan previamente antes de su expresión membranar (Fiorentini C. et al., 2008). La falta de funcionalidad de dichos D3R en su forma dimerica con D1R puede ser explicada por el hecho de que en la dimerización, la activación del D3R incrementa la afinidad y la potencia del D1R por sus ligandos (Fiorentini C. et al., 2008; Avalos-Fuentes A. et al., 2013), por lo tanto, la coactivación con D1R potencia los efectos estimulatorios en lugar de antagonizarlos.

Lo anterior es la huella neuroquímica descrita para la interacción dimerica D1R-D3R (Fiorentini C. et al., 2008). Por otro lado, la cantidad de D1R en estriado es mucho mayor (1193 fmol/mg por proteína, (Demontis M.G. et al., 1990) comparado con el D3R (entre 5-600 fmol/mg por proteína (Levesque D. et al., 1992; Hillefors M. et al., 2001; este trabajo) y no todas las neuronas estriatales expresan D3R (Le Moine C. y Bloch B., 1996). Lo cual refuerza la idea de que en condiciones normales solo hay una interacción dimérica sinérgica entre dichos receptores.

Estos descubrimientos soportan la idea de que todos los D3R estriatales se encuentran en una interacción dimérica y sugiere que no todas las neuronas estriado-nigrales expresan el heterodímero D1R-D3R, lo anterior se refuerza por el hecho de que en terminales nigrales, no en todas las proyecciones provenientes del estriado existe interacción física entre los D3R y los D1R (Cruz-Trujillo R. et al., 2013).

Nuestros datos muestran un incremento en la unión específica del D3R por su ligando [³H]-7-OH-DPAT en membranas estriatales durante la denervación dopaminérgica (fig. 26B), este efecto ocurre sin cambios significativos en la cantidad total de proteína (fig. 25) o del RNAm (fig. 24) indicando que la proteína del D3R citoplasmático es transportado hacia la membrana plasmática o que los D3R previamente localizados en la membrana plasmática ahora son capaces de unir [³H]-7-OH-DPAT, y por ende, probablemente dopamina. Dado que en nuestros experimentos trabajamos con preparaciones membranales crudas, es difícil evaluar si dichos D3R también se encuentran en membranas intracitoplásmicas, sin embargo, el hecho de que al bloquear su señalización de proteínas Gi con NEM se modifique su activación y tenga efectos sobre la formación de AMPc y liberación de GABA (fig. 28 y 29), refuerza fuertemente su localización en la membrana plasmática y su funcionalidad. La funcionalidad de dichos receptores también se ha encontrado en neuronas estriatopalidales durante la denervación dopaminérgica (Prieto G.A. et al., 2011). La principal incógnita que surge a todo lo anterior es: ¿Cuál es el mecanismo por el cual el D3R incrementa en la membrana plasmática durante la denervación dopaminérgica?

Lo más probable es que los cambios en la expresión de la isoforma D3nf sean los responsables de dicho incremento de nuevos D3R en la membrana plasmática. De acuerdo con el modelo propuesto por los grupos de Richtand N.M. et al., y Karpa K.D. et al., (Richtand N.M. et al., 2010; Karpa K.D. et al., 2000), la dimerización del D3R con su isoforma D3nf induce el translocamiento del D3R de la membrana plasmática al interior del citoplasma a compartimentos intracelulares desconocidos hasta la fecha, en otras palabras, la isoforma D3nf secuestra al D3R previniendo su localización membranal y por lo tanto su señalización. Por otro lado, de acuerdo con Elmhurst J.L. et al., (2000) la interacción puede ocurrir a nivel de la membrana plasmática y también inhibir la señalización del D3R.

Con respecto a lo anterior, no importa si la interacción física se produce en la membrana plasmática o en el interior del citoplasma (nosotros no lo podemos evaluar con nuestros experimentos de PLA, sin embargo, se podría añadir a nuestra preparación un anticuerpo dirigido a una proteína constitutiva de la membrana plasmática como la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa), lo sobresaliente es que la denervación dopaminérgica reduce la dimerización D3R-D3nf (Fig. 27). Por lo tanto, dado que ni la proteína total ni el RNAm del D3R se modifican durante la denervación dopaminérgica (Fig. 24 y 25, (Levesque D. et al., 1995)) y el número o densidad de receptores D3R que son capaces de unir $[\text{}^3\text{H}]\text{-7-OH-DPAT}$ incrementan (Fig. 26); es factible suponer que la nueva población de D3R que fue translocada a las membranas provienen de proteínas sintetizadas que no pudieron dimerizar con la isoforma D3nf por que la expresión del D3nf disminuye en esta condición patológica (Fig. 25, Prieto G.A. et al., 2011).

Por otro lado, se detectaron 2 bandas en nuestros experimentos de western blot para el D3R tanto en estriado como en SNr (fig. 25). Se han detectado de 1 a 3 diferentes bandas para el D3R en diferentes células (Gomez M.J. et al., 2002, Chu E. et al., 2004, Nam J. et al., 2008, Kim Y. et al., 2009, Di Ciano L.A. et al., 2015), e incluso utilizando diferentes anticuerpos (Nimchinsky E.A. et al., 1997). En particular, en el estriado ventral utilizando el mismo anticuerpo utilizado en nuestro estudio (Ikeda E. et al., 2013), se pueden detectar 3 bandas que de acuerdo con Nimchinsky E.A. et al., (1997), dichas bandas pueden representar arreglos monoméricos y homodiméricos del D3R.

Sin embargo, aunque nuestras bandas encontradas representen estados monoméricos u homodiméricos del D3R, no encontramos cambios en el contenido total de proteína durante la denervación dopaminérgica.

En este sentido, se ha mostrado que la presencia de la isoforma D3nf puede determinar formas oligoméricas para el D3R, por lo tanto, sería interesante determinar si los nuevos D3R expresados en membranas representan formas oligoméricas o monoméricas (Nimchinsky E.A. et al., 1997), incluyendo formas heterodiméricas con el D1R, de esta manera, lo anterior puede representar otro mecanismo por el cual la isoforma D3nf puede modular la función del D3R: determinando su dimerización en membranas.

La isoforma D3nf parece ser un regulador negativo del D3R, de su localización y/o sensibilización en neuronas (Davis J.R. et al., 2007); expresión incrementada de la isoforma D3nf conlleva a respuestas inhibitorias deprimidas (Elmhurst J.L. et al., 2000) y viceversa (Prieto G.A. et al., 2011, este trabajo). Con respecto a esto, la relación del RNAm de la relación D3R/D3nf es regulada por splicing post transcripcional (Elmhurst J.L. et al., 2000; Richtand N.M. et al., 2010). Además, la relación D3R/D3nf en el cerebro está influenciada por señales dopaminérgicas; Después del bloqueo del D3R, el RNAm de la isoforma D3nf se redujo mientras que la expresión del RNAm de D3R no se modificó (Richtand N.M. et al., 2010), es decir, el estado “hipodopaminérgico” conlleva a un incremento del RNAm en la relación D3R/D3nf (Richtand N.M. et al., 2010). Prieto G.A. et al., (2011) reporto resultados similares, utilizando neuronas espinosas medianas estriatales aisladas, se evidencio que la activación de los D3R no tiene efecto en las corrientes de Ca^{+2} de células obtenidas de animales no lesionados, mientras que en células obtenidas de animales denervados, la activación del D3R tiene profundos efectos inhibitorios sobre las corrientes de Ca^{+2} . Simultáneamente, estos investigadores encontraron un desbalance en la expresión del D3R y su isoforma D3nf, es decir, la isoforma D3nf disminuye su expresión, incrementando la relación D3R/D3nf en el hemisferio lesionado. Por lo tanto, nuevos receptores D3 que son capaces de unir ligando son funcionales y activos contribuyendo al efecto de los agonistas de los receptores dopaminérgicos tipo-D2 (Prieto G.A. et al., 2011).

En nuestro caso, debería estar ocurriendo lo mismo en las neuronas estriatonigrales explicando el aparente cambio en la señalización del D3R durante la denervación.

Al parecer, las variantes truncas generadas por splicing alternativo de varios receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) tienen esta función (Wise H., 2012). Sin embargo, datos recientes sugieren que la función de las isoformas truncadas es mucho más compleja. En evidencia reciente se muestra que la isoforma truncada del receptor de grelina GHS-R1a acoplado a proteínas Gi, la GHS-R1b, no solo determina el tráfico y expresión de la forma funcional R1a, sino que también modula su acople a proteínas Gs ya que promueve su dimerización con D1R (Navarro G. et al., 2016).

Con respecto a nuestros resultados, es posible que la disminución en la expresión de la isoforma D3nf promueva un incremento en el tráfico del D3R hacia la membrana plasmática y en su funcionalidad, así como cambios en sus asociaciones diméricas con el D1R; por lo tanto, el papel de la isoforma D3nf sobre la dimerización y señalización del D3R debe ser explorada en más detalle. Además, tampoco se ha elucidado el papel de los receptores dopaminérgicos sobre la regulación de su propio splicing alternativo, así como los factores que contribuyen a su alteración durante la denervación dopaminérgica.

En resumen, nuestros datos indican que los nuevos D3R membranales representan una nueva y anormal población funcional de D3R expresados en la membrana plasmática, resultados que correlacionan con una disminución en la expresión de la isoforma D3nf, causada probablemente por una desregulación del splicing alternativo. Interesantemente, cambios en la relación D3R/D3nf se han observado en otras patologías relacionadas con el sistema dopaminérgico, como la sensibilización a nicotina (Smith L.N. et al., 2015) y la esquizofrenia (Schmauss C., 1996), resaltando la importancia de la isoforma D3nf en la homeostasis y función del D3R, la cual es alterada durante la denervación dopaminérgica, así como en otras patologías neuropsiquiátricas.

15.2 Coexistencia de la señalización “típica” y “atípica” del D3R durante la denervación dopaminérgica.

Se ha descrito previamente que la denervación dopaminérgica modifica substancialmente la señalización del D3R, pero interesantemente, las respuestas del hemisferio control no lesionado de los animales denervados unilateralmente se mantienen en la misma magnitud y sentido como los descritos para animales no denervados (Avalos-Fuentes A. et al., 2013 y 2015), indicando que al menos para las respuestas medidas en este trabajo no existen cambios o mecanismos compensatorios en el hemisferio no lesionado y valida la comparación de los cambios entre los hemisferios tomando el hemisferio no lesionado como control.

Estudios de disposición/interacción entre proteínas de los D1R, D3R y D1R-D3R indican diversas formas de asociación y también una variedad de efectos sobre su señalización y sobre su efecto a nivel conductual. Se ha descrito un homodímero D1R-D1R asociado a su clásica proteína de señalización Gs/olf (Casado V. et al., 2009; Herrick-Davis K. et al., 2013; Casado-Anguera V. et al., 2019); un heterodímero D1R-D3R con una interacción sinérgica sobre la formación de AMPc, liberación de GABA y actividad locomotora (Marcellino D. et al., 2008; Fiorentini C. et al., 2008; Cruz-Trujillo R. et al., 2013; Avalos-Fuentes A. et al., 2013 y 2015); un homodímero D1R-D1R asociado a un homodímero D3R-D3R formando en su conjunto un heterotetrámero el cual ejerce un efecto antagónico sobre la formación de AMPc y sinérgica sobre la señalización de MAPK y AKT (Guitart X. et al., 2014) y sobre la actividad locomotora (Guitart et al., 2019); así como varias formas de homodímeros D3R (Nimchinsky E.A. et al., 1997).

Con lo anterior en mente, es posible que durante la denervación dopaminérgica se lleven a cabo rearrreglos o cambios en la disposición dimérica de la nueva población de D3R y que dichos cambios sean responsables de los efectos observados durante el cambio de señalización del D3R sobre la formación de AMPc y liberación de GABA (fig. 28 y 29) durante la activación de D1R y/o D3R.

Además, el bloqueo de la señalización de las proteínas Gi del D3R con NEM desenmascaró la señalización sinérgica del heterodímero D1R-D3R indicando que muy probablemente existen diferentes disposiciones de los D1R, D3R y D1R-D3R durante un estado de denervación, así como en un estado normal. Sin embargo, con nuestro enfoque no podemos determinar la presencia de dichas disposiciones oligoméricas, sin embargo, algunas de ellas pueden explicar los resultados obtenidos.

La interacción física D1R-D3R se mantiene después de la denervación dopaminérgica (Farré D. et al., 2015 y fig. 27) y nuevos D3R aparecen en membranas estriatales (fig. 26), por lo tanto tenemos 3 posibles mecanismos de control sobre la formación de AMPc y liberación de GABA en neuronas estriatonigrales: monómeros D1R (homodímeros D1R-D1R), D1R-D3R sinérgicos (heterodímeros) y los nuevos D3R (o heterotetrámero D1R-D1R/D3R-D3R antagónicos, o monómeros y/o homodímeros D3R que se oponen a los efectos estimulatorios del D1R en cualquier disposición en la que se encuentren) que pueden señalar y modificar la función.

En el estado normal, solo las respuestas de los D1R (monómeros u homodímeros) y los heterodímeros sinérgicos D1R-D3R se pueden observar (Fiorentini C. et al., 2008; Marcellino D. et al., 2008; Cruz-Trujillo R. et al., 2013; Avalos-Fuentes A. et al., 2013 y 2015). La activación del D1R con SKF 38393 estimula la formación de AMPc aproximadamente un 25% en el hemisferio control (Avalos-Fuentes A. et al., 2013; fig. 28A, E) este efecto corresponde a D1R solos o heterodímeros con D3R (que no están acoplados a Gi), mientras que la activación del D3R con PD 128,907 en heterodímeros agrega una extra estimulación en la formación de AMPc de cerca del 25% que por su parte se refleja en la liberación de GABA, indicando la funcionalidad de los heterodímeros (Avalos-Fuentes A. et al., 2013; fig. 28A, E y 29B, D).

Dado que en el estado normal solo se observan las respuestas de D1R y D1R-D3R sinérgicas y el bloqueo de la señalización de las proteínas Gi no modifica tales respuestas (fig. 28B, F) la señalización típica del D3R acoplado a proteínas Gi no existe en el estado normal (fig. 28B, F, E y F).

Además, probablemente las respuestas vienen de diferentes poblaciones de neuronas espinosas medianas que proyectan a la SNr o que expresan D1R solo o los heterodímeros D1R-D3R, sin embargo, lo anterior debe ser comprobado de manera experimental. Interesantemente se han descrito recientemente 2 poblaciones de neuronas estriatonigrales relacionadas al tratamiento con L-DOPA en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson (Fieblinger T. et al., 2018) sugiriendo heterogeneidad en las neuronas estriatales de proyección hacia la SNr.

En contraste, durante la denervación dopaminérgica aparecen nuevos D3R con capacidad de señalización típica (acoplados a Gi) antagónicos con respecto al D1R (fig. 28 y 29). Estos nuevos D3R antagonizan la actividad del D1R (solo o formando heterodímeros con el D3R) a nivel del adenilato ciclasa (Avalos-Fuentes A. et al., 2013). Una posible explicación a estos resultados es que durante la denervación dopaminérgica estas interacciones diméricas se pierden. Sin embargo, la evidencia de que dicha interacción o proximidad persiste durante la denervación (fig. 13) e incluso puede incrementar (Farré D. et al., 2015), indica que la interacción dimérica se mantiene y que los nuevos D3R no están en una asociación dimérica con el D1R o en su defecto la interacción cambia al previamente descrito heterotetrámero antagónico D1R-D1R/D3R-D3R (Guitart X. et al., 2014) y es funcionalmente activo (fig. 28D y H).

Sin embargo, nosotros creemos que un arreglo heterotetrámero no es probable ya que el NEM desenmascara las interacciones sinérgicas D1R-D3R previamente observadas en el estado normal; por lo tanto, lo más probable es que los nuevos D3R se encuentran en disposiciones mono u homodiméricas. Por otro lado, los heterodímeros D1R-D3R parecen estar ensamblados previamente, es decir, antes de su expresión en la membrana plasmática (Fiorentini C. et al., 2008), por lo tanto, los D3R que incrementan en la membrana durante la denervación no están en asociación dimérica con el D1R. Esta interacción antagónica observada entre los D3R vs. D1R y D1R-D3R puede ocurrir quizá porque los nuevos D3R aparecieron en las neuronas que expresan el D1R o el heterodímero D1R-D3R, ya que su activación previene todos los incrementos en la formación de AMPc y liberación de GABA (fig. 28C, G y 28B, D). Si el efecto de los nuevos D3R solo se diera en solo un tipo de neurona, la disminución en la formación de AMPc y liberación de GABA sería una fracción de la cantidad total, sin embargo, eso no ocurre.

Cuando analizamos la potencia del agonista selectivo del D3R PD 128, 907 (Pugsley T.A. et al., 1995) en la interacción sinérgica D1R-D3R esta alrededor de 75 nM (Avalos-Fuentes A. et al., 2013) y en la relación antagónica durante la denervación dopaminérgica esta alrededor de 4 nM (Avalos-Fuentes A. et al., 2015), esto sugiere mayor sensibilidad del D3R que señala por su cuenta (acoplado a proteínas Gi) con respecto a los D3R en su disposición dimérica sinérgica, resaltando la sensibilidad y la eficacia sobre los efectos inhibitorios en la liberación de GABA. La magnitud de las respuestas del D1R y del heterodímero D1R-D3R desenmascaradas por la aplicación de NEM, es consistentemente mayor en denervación con respecto al estado normal tanto en formación de AMPc como en liberación de GABA (figuras 28 y 29). Dado que la señalización del D1R involucra la actividad del adenilato ciclasa, la supersensibilidad de dicho efector explica la magnitud mayor de la respuesta (Rangel-Barajas C. et al., 2011).

Un hallazgo intrigante es la falta de regulación del D3R por la CaMK II en el heterodímero sinérgico D1R-D3R y en la relación antagónica durante la denervación, como se puede observar en los experimentos de liberación de GABA (fig. 29D). El papel de la CaMK II en la regulación de la transmisión sináptica en los ganglios basales es muy complejo. Cuando la CaMK II es reclutada a sitios sinápticos en respuesta al influjo de Ca^{+2} la función del D3R es bloqueada (Lui X.Y. et al., 2009; Avalos-Fuentes A. et al., 2013) y se pierde durante la denervación dopaminérgica por una disminución en la expresión del activador de la CaMK II: la Calmodulina (Avalos-Fuentes A. et al., 2015). Esto es consistente con Moriguchi S. et al., (2012), ellos encontraron que después del tratamiento con MPTP, la autofosforilación de la CaMK II disminuye significativamente en el hipocampo y en el estriado de ratón. En contraste, Picconi B. et al., (2004) encontró que después de la denervación, los niveles de autofosforilación de la CaMK II en el estriado se incrementaron y que la administración intraestriatal del inhibidor de la CaMK II el KN-92 revirtió los efectos fisiológicos de la denervación. Esta controversia debería ser explorada en más detalle, sin embargo, si la falta de control de la CaMK II sobre la actividad del D3R afecta ambos tipos de receptores; heterodímero sinérgico D1R-D3R señalización “atípica” y el D3R antagónico “típico”, este es un factor que contribuye a la falta de control de la actividad aberrante del D3R y probablemente al control fisiológico de la actividad dimérica.

Claramente, la señalización del D3R es compleja y probablemente las diferencias están relacionadas con diversos factores. Por lo tanto, nuestros resultados indican que, durante la denervación dopaminérgica, las respuestas sinérgicas y antagónicas del D3R pueden coexistir en neuronas estriatales, y como se describió previamente (Prieto G.A. et al., 2011) la respuesta del D3R es sensibilizada, es decir, incrementa la potencia del D3R por la dopamina, existe una supersensibilidad del efector de la respuesta del D1R: adenilato ciclasa y por la falta de regulación de la CaMK II en la actividad del receptor.

15.3 Repercusión de la señalización típica y atípica del D3R sobre la conducta motora.

Dado que la señalización típica del D3R enmascara la atípica (sinérgica) y a que ambas pueden coexistir durante la denervación e impactar la liberación de GABA (fig. 29), en nuestra última serie de experimentos queríamos saber si lo anterior puede reflejarse en un efecto a nivel motor. La SNr representa el núcleo de salida de la información de los ganglios basales y el punto final de la modulación dopaminérgica de las señales provenientes del estriado y por ende modula el control motor (Robertson H.A., 1992). De hecho, el control presináptico dopaminérgico sobre la liberación de GABA y glutamato a nivel nigral modifica la actividad de las neuronas GABAérgicas de salida y el control motor (Rodríguez-Sánchez M. et al., 2019).

Nuestro enfoque experimental fue evaluar la activación de los D1R y D3R de manera individual y su coactivación por medio de inyecciones de sus agonistas selectivos directamente en la SNr, solos o en la presencia de NEM para bloquear la señalización de las proteínas Gi. Para asegurar que la respuesta motora era debido a la activación de un tipo de receptor dopaminérgico, antagonizamos a los D1R y D3R con sus antagonistas reversibles selectivos antes de la administración del antagonista irreversible (60 minutos después) de los receptores dopaminérgicos el EEDQ, con la finalidad de evitar la activación de otros GPCRs que pudieran interferir en respuesta a cambios en neurotransmisores (Meller E. et al., 1988).

Por otro lado, la especificidad de los efectos a nivel de la SNr producidos por las inyecciones intranigrales es reforzada por el hecho de que cuando se inyecta SKF 38393 fuera de la SNr, la conducta de giro generada fue mucho menor y aberrante como se muestra en la figura 30C. Además, la magnitud de los efectos de las inyecciones intranigrales son debido a los fármacos por sí mismos y no por el grado de denervación ya que la magnitud de giros inducidos por anfetamina por los cuales los animales fueron seleccionados para los experimentos es homogénea entre todos los grupos experimentales (fig. 30D).

Como ocurre en animales no denervados (Jackson E.A. y Kelly P.H., 1983; Asin K.E. y Montana W.E., 1988; Trevitt J.T. et al., 2001), la activación intranigral de D1R tiene un profundo efecto estimulador sobre la conducta motora manifestado por la generación de giros contralaterales (fig. 30B) debido a la estimulación unilateral. Esto es explicado por la importante movilización de GABA y a la sensibilidad preferencial del GABA con respecto al glutamato de las neuronas de salida de la SNr (Windels F. y Kiyatkin E.E., 2004), a pesar de la movilización concomitante de glutamato por D1R en las terminales subtálamo-nigrales (Rosales M.G. et al., 1997). En este efecto del D1R sobre la conducta motora durante la denervación, deben ocurrir incrementos mayores en la formación de AMPc y liberación de GABA con respecto a la condición normal (Floran B. et al., 1990; Rangel-Barajas C. et al., 2008); y porque la liberación de GABA en terminales estriatonigrales es regulada por el D1R a través de la vía adenilato ciclasa→cAMP→PKA incluyendo los efectos por la interacción con el D3R (Nava-Asbell C. et al., 2007; Avalos-Fuentes A. et al., 2013 y 2015).

Durante la denervación, la activación del D3R se opone a los efectos estimuladores de la activación del D1R sobre los giros contralaterales, esto es compatible con el efecto antagónico del D3R sobre el D1R sobre la liberación de GABA que encontramos en nuestras preparaciones in vitro, sin embargo, no lo elimina totalmente (fig. 30B). Estos giros contralaterales residuales representan la activación de D3R con capacidad de señalizar ya que cuando se administró el NEM se previno el total de giros contralaterales inducidos (fig. 30B) y no está asociado a D1R por que la administración intranigral de PD 128, 907 produce giros contralaterales de similar intensidad a los producidos por el SKF 38393+PD 128,907.

Lo más probable es que los efectos del PD 128, 907 representan el control de la liberación de glutamato por D3R de neuronas subtálamo-nigrales (Briones-Lizardi L.J. et al., 2019; Rodriguez-Sanchez M. et al., 2019), ya que durante la denervación existe un importante incremento en el disparo de las neuronas subtalámicas (Kreiss D.S. et al., 1997) que se traduce en un incremento de la liberación de glutamato y también el control de la liberación de glutamato presináptico por D3R está sensibilizado (Briones LS-Z et al., 2016). La disminución en la liberación de glutamato produce una disminución en la actividad de las neuronas de salida favoreciendo la conducta motora. Este D3R nigral puede ser importante en el efecto terapéutico de los agonistas preferenciales del D3R como el Pramipexol, el cual en etapas iniciales de la enfermedad de Parkinson produce un efecto terapéutico asociado no solo a un efecto trófico en las neuronas dopaminérgicas remanentes sino también en la regulación de la liberación de glutamato (Briones-Lizardi L.J. et al., 2019).

La administración de NEM no modificó la conducta motora, además de indicar la seguridad del uso del fármaco también indica que ningún otro receptor acoplado a proteínas Gi que modifica la liberación de GABA o glutamato está lo suficientemente activo para inducir un desbalance motor. Sin embargo, la administración de NEM desenmascara la potenciación ejercida por la coactivación de los D3R y D1R sobre los giros contralaterales que corresponde al heterodímero sinérgico D1R-D3R traducida en la liberación de GABA de nuestros experimentos *in vitro*. Importantly, la cantidad de giros es mayor que la activación del D1R individual, explicado también por la supersensibilidad del adenilato ciclasa durante la denervación (Rangel-Barajas C. et al., 2011).

Estos efectos sobre la conducta motora tras las manipulaciones locales intranigrales de los D3R interactuando con D1R concuerdan con las observaciones *in vitro* y refleja la compleja interacción entre los receptores durante la denervación, también indica que los receptores nigrales son un importante sitio de acción de fármacos que modifican su actividad como ocurre en un estado normal (Rodriguez-Sanchez M. et al., 2019).

Sin embargo, nos debe hacer reflexionar que el resultado de la administración de fármacos con actividad sobre los D3R en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson son diversos y que el diseño de estrategias para focalizar selectivamente los efectos debe tenerse en consideración. Otros factores como la complejidad de la señalización del D3R (Prieto G.A. et al., 2017; Rangel-Barajas C. et al., 2015), la extensa distribución de receptores (Sokoloff P. y Le Foll., 2017) y los arreglos monoméricos y/o dimericos del D3R (Cortes A. et al., 2016) deberían de tenerse en consideración para obtener los efectos deseados.

16 CONCLUSIÓN

La denervación dopaminérgica induce la presencia de una nueva población funcional de D3R en neuronas estriatonigrales que enmascaran la respuesta sinérgica del heterodímero D1R-D3R sobre la formación de AMPc y liberación de GABA observado en el estado normal. Además, la señalización típica y atípica del D3R coexisten durante la denervación dopaminérgica e impacta en la conducta motora. Los cambios en la expresión de la isoforma D3nf correlacionan con el aparente cambio de señalización del D3R y puede participar en los cambios de las respuestas observadas.

17 CONTRIBUCIONES

Las siguientes personas contribuyeron directamente a la realización de experimentos en este proyecto de investigación:

-RTq-PCR (Fig. 24) se realizaron en colaboración con el Instituto Nacional de Rehabilitación y el hospital Iro. de Octubre con la colaboración del Dr. Hernán Cortés Callejas y la M.C. Celia Piña Leyva.

-Binding (Fig. 26) en colaboración con el auxiliar de investigación del laboratorio, Dr. José Arturo Aválos Fuentes.

-PLA (Fig. 27) en colaboración con el Dr. Rodolfo Sánchez Zavaleta.

-AMPc y liberación de [³H]-GABA (Fig. 28 y 29) en colaboración con los auxiliares de investigación del laboratorio, Dr. José Arturo Aválos Fuentes y Q.F.B Francisco Javier Paz Bermúdez.

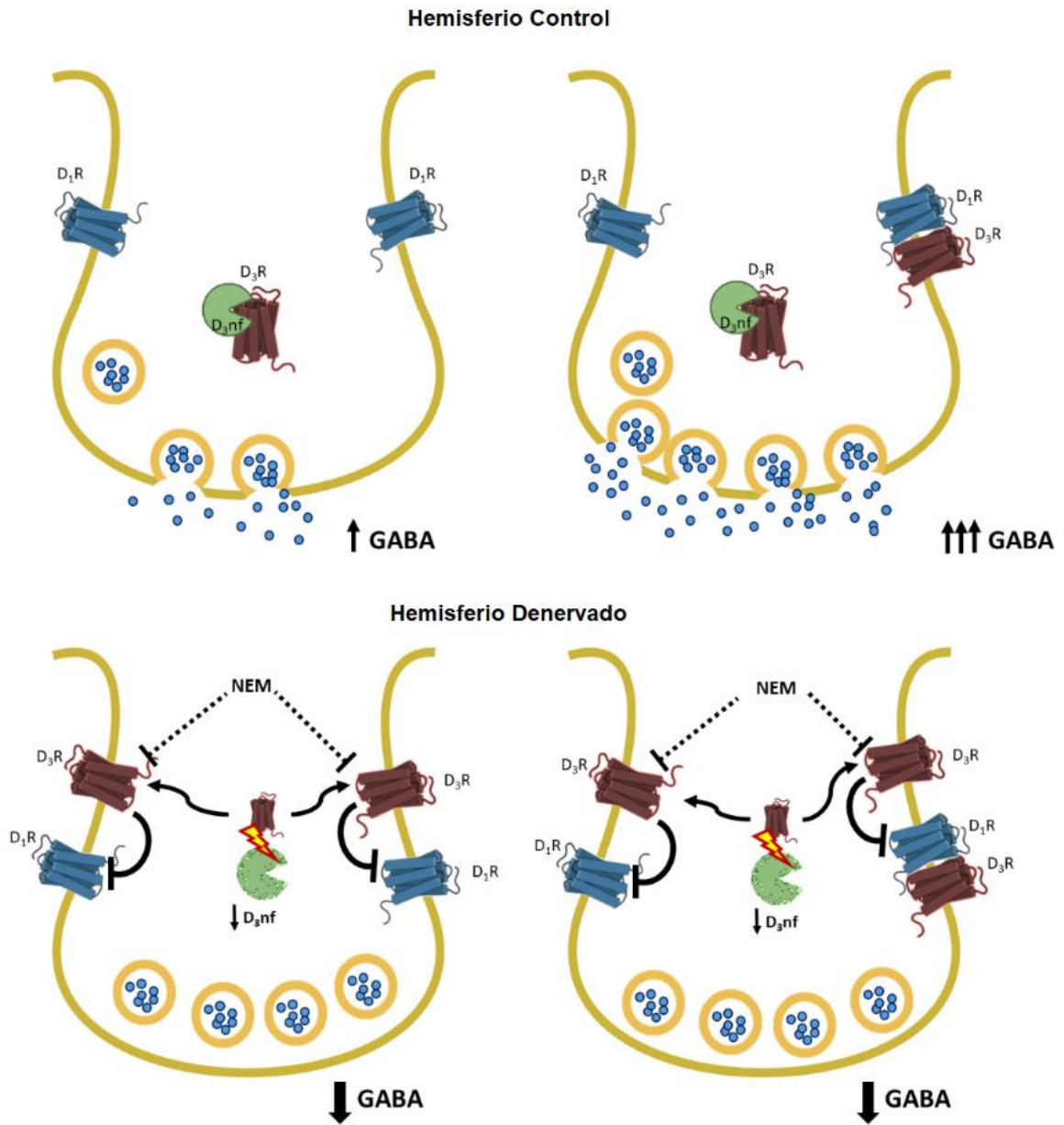


Fig. 32. Esquema ilustrativo del mecanismo de modulación propuesto de la isoforma D3nf sobre los D1R y el heterodimero D1R-D3R. La denervación dopaminérgica induce un incremento en D3R membranales que se oponen a los efectos estimulatorios del D1R y del heterodimero D1R-D3R sobre la formación de AMPc y liberación de GABA. Estas interacciones coexisten durante la denervación dopaminérgica e impactan la conducta motora, además, correlacionan con cambios en la expresión de la isoforma D3nf.

18 BIBLIOGRAFÍA

Aarsland D, Creese B, Chaudhuri KR. 2017. A new tool to identify patients with Parkinson's disease at increased risk of dementia. *Lancet Neurol.* 16(8):576-578.

Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, Lachowicz JE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR, Gerfen CR, Westphal H, Fuchs S. 1996. A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;93(5):1945-9.

Adler CH, Meller E, Goldstein M. 1985. Recovery of alpha 2-adrenoceptor binding and function after irreversible inactivation by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ). *Eur J Pharmacol* 116(1-2):175-178.

Albarran-Bravo S, Avalos-Fuentes JA, Cortes H, Rodriguez-Sanchez M, Leyva-Garcia N, Rangel-Barajas C, Erlij D, Floran B. 2019. Severity of Dyskinesia and D3R Signaling Changes Induced by L-DOPA Treatment of Hemiparkinsonian Rats Are Features Inherent to the Treated Subjects. *Biomolecules* 9(9).

Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 9;357-381.

Alexander, S. P., 1995. The measurement of cyclic AMP levels in biological preparations. *Methods Mol Biol.* 41, 79-89.

Araki KY, Sims JR, Bhide PG. 2007. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res.* 1156:31-45.

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

Arias-Montano JA, Floran B, Floran L, Aceves J, Young JM. 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.

Asin KE, Montana WE. 1988. Rotation following intranigral injections of a selective D1 or a selective D2 dopamine receptor agonist in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 29(1):89-92.

Avalos-Fuentes A, Albarran-Bravo S, Loya-Lopez S, Cortes H, Recillas-Morales S, Magana JJ, Paz-Bermudez F, Rangel-Barajas C, Aceves J, Erlij D, Floran B. 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. *Neurobiology of disease* 74:336-346.

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

Angers S, Salahpour A, Bouvier M. 2002. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:409-35.

Barik S, de Beaurepaire R. 1998. Hypothermic effects of dopamine D3 receptor agonists in the island of Calleja Magna. Potentiation by D1 activation. *Pharmacol Biochem Behav* 60(2):313-319.
Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. 2010. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23(4):228-42.

Betancur C, Lépée-Lorgeoux I, Cazillis M, Accili D, Fuchs S, Rostène W. 2001. Neurotensin gene expression and behavioral responses following administration of psychostimulants and antipsychotic drugs in dopamine D(3) receptor deficient mice. *Neuropsychopharmacology.* 24(2):170-82.

Bockaert J. 1991. Coupling of receptors to G proteins, pharmacological implications. *Therapies.* 46(6):413-20.

Bonaventura J, Rico AJ, Moreno E, Sierra S, Sanchez M, Luquin N, Farre D, Muller CE, Martinez-Pinilla E, Cortes A, Mallol J, Armentero MT, Pinna A, Canela EI, Lluís C, McCormick PJ, Lanciego JL, Casado V, Franco R. 2014. L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A(2A) adenosine-CB(1) cannabinoid-D(2) dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology* 79:90-100.

Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P. 2003. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* 24(3):159-60.

Bontempi L, Savoia P, Bono F, Fiorentini C, Missale C. 2017. Dopamine D3 and acetylcholine nicotinic receptor heteromerization in midbrain dopamine neurons: relevance for neuroplasticity. *Eur Neuropsychopharmacol.* 27:313–324.

Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. 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.

Bouvier M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews Neuroscience*. 2(4):274-86.

Briones LS-Z, R. Erlij, D. Aceves, J. Floran, B. 2016. CAMKII does not modulate D3 receptor effect on [3H] Glutamate release in the rat substantia nigra. *Soc Neurosc Abstrc* 498.12 / F41.

Briones-Lizardi LJ, Cortes H, Avalos-Fuentes JA, Paz-Bermudez FJ, Aceves J, Erlij D, Floran B. 2019. Presynaptic control of [(3)H]-glutamate release by dopamine receptor subtypes in the rat substantia nigra. Central role of D1 and D3 receptors. *Neuroscience* 406:563-579.

Casado-Anguera V, Moreno E, Mallol J, Ferre S, Canela EI, Cortes A, Casado V. 2019. Reinterpreting anomalous competitive binding experiments within G protein-coupled receptor homodimers using a dimer receptor model. *Pharmacol Res* 139:337-347.

Casado V, Cortes A, Mallol J, Perez-Capote K, Ferre S, Lluís C, Franco R, Canela EI. 2009. GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacol Ther* 124(2):248-257.

Chabre M, Deterre P, Antonny B. 2009. The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci*. 30:182–187.

Chen G, Kittler JT, Moss SJ, Yan Z. 2006. Dopamine D3 receptors regulate GABAA receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci*. 26:2513–2521.

Chio CL, Lajiness ME, Huff RM. 1994. Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol*. 45:51–60.

Chu E, Chu J, Socci RR, Chu TC. 2004. 7-OH-DPAT-induced inhibition of norepinephrine release in PC12 cells. *Pharmacology* 70(3):130-139.

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. 1996. *The biochemical basis of neuropharmacology*. 7th. Ed. New York/Oxford, Oxford University Press. 293-351.

Cortes A, Moreno E, Rodriguez-Ruiz M, Canela EI, Casado V. 2016. Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies. *Expert Opin Drug Discov* 11(7):641-664.

Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. 1967. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med.* 276(7):374-379.

Cruz-Trujillo R, Avalos-Fuentes A, Rangel-Barajas C, Paz-Bermudez F, Sierra A, Escartin-Perez E, Aceves J, Erlij D, Floran B. 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.

Cussac D, Newman-Tancredi A, Pasteau V, Millan MJ. 1999. Human dopamine D(3) receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation via a phosphatidylinositol 3-kinase and an atypical protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 56:1025–1030.

Davis JR, Kakar M, Lim CS. 2007. Controlling protein compartmentalization to overcome disease. *Pharm Res* 24(1):17-27.

Demontis MG, Fadda P, Devoto P, Martellotta MC, Fratta W. 1990. Sleep deprivation increases dopamine D1 receptor antagonist [3H]SCH 23390 binding and dopamine-stimulated adenylate cyclase in the rat limbic system. *Neurosci Lett* 117(1-2):224-227.

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

Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, Sokoloff P. 2000. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20(23):8677-8684.

Di Ciano LA, Azurmendi PJ, Colombero C, Levin G, Oddo EM, Arrizurieta EE, Nowicki S, Ibarra F. 2015. Defective renal dopamine function and sodium-sensitive hypertension in adult ovariectomized Wistar rats: role of the cytochrome P-450 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F1358–F1368.

Ekman A, Nissbrandt H, Heilig M, Dijkstra D, Eriksson E. 1998. Central administration of dopamine D3 receptor antisense to rat: effects on locomotion, dopamine release and [3H]spiperone binding. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:342–350.

Elmhurst JL, Xie Z, O'Dowd BF, George SR. 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.

Evatt ML. 2014. Parkinson disease: Low vitamin D and Parkinson disease--a causal conundrum. *Nat Rev Neurol.* 10(1):8-9.

- Everett PB, Senogles SE. 2010. D3 dopamine receptor signals to activation of phospholipase D through a complex with Rho. *Journal of neurochemistry* 112(4):963-971.
- Farran B. 2017. An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. *Pharmacol Res.* 117:303–327.
- Farré D, Munoz A, Moreno E, Reyes-Resina I, Canet-Pons J, Dopeso-Reyes IG, Rico AJ, Lluís C, Mallol J, Navarro G, Canela EI, Cortes A, Labandeira-Garcia JL, Casado V, Lanciego JL, Franco R. 2015. Stronger Dopamine D1 Receptor-Mediated Neurotransmission in Dyskinesia. *Mol Neurobiol* 52(3):1408-1420.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. 1997. *Principles of neuropsychopharmacology*. Sunderland, Sinauer.277-344.
- Ferré S, Casadó V, Devi LA, et al. 2014. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev.* 66:413–434.
- Ferré S, Baler R, Bouvier M, et al. 2009. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* 5:131–134.
- Fieblinger T, Zanetti L, Sebastianutto I, Breger LS, Quintino L, Lockowandt M, Lundberg C, Cenci MA. 2018. Striatonigral neurons divide into two distinct morphological-physiological phenotypes after chronic L-DOPA treatment in parkinsonian rats. *Sci Rep* 8(1):10068.
- Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C. 2008. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Molecular pharmacology* 74(1):59-69.
- Fishburn CS, Belleli D, David C, Carmon S, Fuchs S. 1993. A novel short isoform of the D3 dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *Journal of Biological Chemistry.* 15;268(8):5872-8.
- Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D. 1990. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116(1-2):136-140.
- Flores G, Liang JJ, Sierra A, Martinez-Fong D, Quirion R, Aceves J, Srivastava LK. 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.

- Flores G, Barbeau D, Quirion R, Srivastava LK. 1996. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci.* 15;16(6):2020-6.
- Freitas ME, Ruiz-Lopez M, Fox SH. 2016. Novel levodopa formulations for Parkinson's disease. *CNS Drug.* 30(11):1079-1095.
- Fu D, Skryabin BV, Brosius J, Robakis NK. 1995. Molecular cloning and characterization of the mouse dopamine D3 receptor gene: an additional intron and an mRNA variant. *DNA Cell Biol.* 14(6):485-92.
- Fujieda H, Scher J, Lukita-Atmadja W, Brown GM. 2003. Gene regulation of melatonin and dopamine receptors during eye development. *Neuroscience* 120(2):301-307.
- Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D. 2002. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.*13(3):100-5.
- Gerfen CR, & Surmeier DJ. 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, 34, 441–66.
- George SR, O'Dowd BF, Lee SP. 2002. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 1(10):808-20.
- Giros B, Martres MP, Pilon C, Sokoloff P, Schwartz JC. 1991. Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;176(3):1584-92.
- Gomes I, Ayoub MA, Fujita W, et al. 2016. G protein-coupled receptor heteromers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 56:403–425.
- Gomez MJ, Rousseau G, Nadeau R, Berra R, Flores G, Suarez J. 2002. Functional and autoradiographic characterization of dopamine D2-like receptors in the guinea pig heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 578–587.
- Griffon N, Pilon C, Sautel F, Schwartz JC, Sokoloff P. 1997. Two intracellular signaling pathways for the dopamine D3 receptor: opposite and synergistic interactions with cyclic AMP. *Journal of neurochemistry* 68(1):1-9.

Guitart X, Moreno E, Rea W, Sanchez-Soto M, Cai NS, Quiroz C, Kumar V, Bourque L, Cortes A, Canela EI, Bishop C, Newman AH, Casado V, Ferre S. 2019. Biased G Protein-Independent Signaling of Dopamine D1-D3 Receptor Heteromers in the Nucleus Accumbens. *Mol Neurobiol* 56(10):6756-6769.

Guitart X, Navarro G, Moreno E, Yano H, Cai NS, Sanchez-Soto M, Kumar-Barodia S, Naidu YT, Mallol J, Cortes A, Lluís C, Canela EI, Casado V, McCormick PJ, Ferre S. 2014. Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1-D3 receptor heterotetramer. *Molecular pharmacology* 86(4):417-429.

Gurevich EV, Himes JW, Joyce JN. 1999. Developmental regulation of expression of the D3 dopamine receptor in rat nucleus accumbens and islands of Calleja. *J Pharmacol Exp Ther*. 89(1):587-98.

Haugarvoll K, Wszolek ZK. 2009. Clinical features of LRRK2 parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*.15 Suppl 3:S205-8.

Hemsley KM, Crocker AD. 1998. The effects of an irreversible dopamine receptor antagonist, N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), on the regulation of muscle tone in the rat: the role of the substantia nigra. *Neurosci Lett* 251(2):77-80.

Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE. 2013. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Molecular pharmacology* 84(4):630-642.

Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H. 2002. Central mechanisms of motor learning. *Curr Opin Neurobiol*. 12:217– 222.

Hillefors M, von Euler G. 2001. Pharmacology of [3H]R(+)-7-OH-DPAT binding in the rat caudate-putamen. *Neurochem Int* 38(1):31-42.

Horrocks LA, Yeo YK. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res*. 40(3):211-25.

Ikeda E, Matsunaga N, Kakimoto K, Hamamura K, Hayashi A, Koyanagi S, Ohdo S. 2013. Molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of dopamine D3 receptor expression in mouse ventral striatum. *Molecular pharmacology* 83(5):959-967.

- Ilani T, Fishburn CS, Levavi-Sivan B, Carmon S, Raveh L, Fuchs S. 2002. Coupling of dopamine receptors to G proteins: studies with chimeric D2/D3 dopamine receptors. *Cell Mol Neurobiol.* 22:47–56.
- Jackson EA, Kelly PH. 1983. Nigral dopaminergic mechanisms in drug-induced circling. *Brain Res Bull* 11(5):605-611.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther* 64:291–370.
- Jankovic J, Aguilar LG. 2008. Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 4(4):743-57.
- Javitch JA, Fu D, Chen J. 1995. Residues in the fifth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor exposed in the binding-site crevice. *Biochemistry.* 19;34(50):16433-9.
- Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, De La Calle A. 1998. Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol.* 21;402(3):353-71.
- Karpa KD, Lin R, Kabbani N, Levenson R. 2000. The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Molecular pharmacology* 58(4):677-683.
- Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. 2013. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53:531–556.
- Kebabian JW, Calne DB. 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93–96.
- Kenakin T, Agnati LF, Caron M, et al. 2010. International workshop at the Nobel Forum, Karolinska Institutet on G protein-coupled receptors: finding the words to describe monomers, oligomers, and their molecular mechanisms and defining their meaning. Can a consensus be reached? *J Recept Sig Transd.* 30:284–286.
- Kim Y, Kim M, Kim H, Kim K. 2009. Effect of lavender oil on motor function and dopamine receptor expression in the olfactory bulb of mice. *J Ethnopharmacol* 125(1):31-35.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 9;392(6676):605-8.

Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1988. Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*. 3;240(4857):1310-6.

Kong MC, Christopher HSo, Brian F. O'Dowd, and Susan R. 2005. The Role of Oligomerization in G Protein-Coupled Receptor Maturation. *The G Protein-Coupled Receptors Handbook* (pp.287-307).

Kowal SL, Dall TM, Chakrabarti R, Storm MV, Jain A. 2013. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. *Mov Disord*. 28(3):311-8.

Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, Walters JR. 1997. The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 17(17):6807-6819.

Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, et al. 2009. Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *J Biol Chem*. 284:26732–26741.

Kuzhikandathil EV, Oxford GS. 1999. Activation of human D3 dopamine receptor inhibits P/Q-type calcium channels and secretory activity in AtT-20 cells. *J Neurosci*. 19:1698–1707.

Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM. 1993. Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur J Neurosci*. 1;5(2):145-53.

Larson ER, Ariano MA. 1995. D3 and D2 dopamine receptors: visualization of cellular expression patterns in motor and limbic structures. *Synapse* 20(4):325-337.

Lee CJ, Irizarry K. 2003. Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation. *Biol Psychiatry*.15;54(8):771-6.

Lee SP, Xie Z, Varghese G, Nguyen T, O'Dowd BF, George SR. 2000. Oligomerization of dopamine and serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology*. 23(4 Suppl):S32-40.

Lee, S.P., O'Dowd, B.F., Ng, G.Y., Varghese, G., Akil, H., Mansour, A., Nguyen, T., George, S.R., 2000. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Molecular Pharmacology* 58 (1), 120–128.

Le Moine C, Bloch B. 1996. Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73(1):131-143.

Levant B. 1998. Differential distribution of D3 dopamine receptors in the brains of several mammalian species. *Brain Res* 800(2):269-274.

Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P. 1992. Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17):8155-8159.

Levesque D, Martres MP, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P, Schwartz JC. 1995. A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1719-1723.

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

Liu XY, Mao LM, Zhang GC, Papsian CJ, Fibuch EE, Lan HX, Zhou HF, Xu M, Wang JQ. 2009. Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII. *Neuron* 61(3):425-438.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 25(4):402-408.

Lopez-Gimenez JF, Canals M, Pediani JD, et al. 2007. The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol Pharmacol*. 71:1015–1029.

Lotia M, Jankovic J. 2016. New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother* 17(7):895-909.

Marcellino D, Ferre S, Casado V, Cortes A, Le Foll B, Mazzola C, Drago F, Saur O, Stark H, Soriano A, Barnes C, Goldberg SR, Lluís C, Fuxe K, Franco R. 2008. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 283(38):26016-26025.

- Maniatis T, Tasic B. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*. 11;418(6894):236-43.
- Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 26:81-104.
- Meller E, Goldstein M, Friedhoff AJ, Schweitzer JW. 1988. N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ): a new tool to probe CNS receptor function. *Adv Exp Med Biol* 235:121-136.
- Meller E, Bohmaker K, Goldstein M, Friedhoff AJ. 1985. Inactivation of D1 and D2 dopamine receptors by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline in vivo: selective protection by neuroleptics. *J Pharmacol Exp Ther*. 233(3):656-62.
- Menalled LB, Dziewczapolski G, Garcia MC, Rubinstein M, Gershanik OS. 1999. D3 receptor knockdown through antisense oligonucleotide administration supports its inhibitory role in locomotion. *Neuroreport*. 19;10(15):3131-6.
- Milligan G. 2013. The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization. *Mol Pharmacol*. 84:158–169.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, and Caron MG. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78, 189-225.
- Moriguchi S, Yabuki Y, Fukunaga K. 2012. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. *Journal of neurochemistry* 120(4):541-551.
- Nagai Y, Ueno S, Saeki Y, Soga F, Yanagihara T. 1993. Expression of the D3 dopamine receptor gene and a novel variant transcript generated by alternative splicing in human peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 15;194(1):368-74.
- Nam J, Kim K. 2008. Abnormal motor function and the expression of striatal dopamine D2 receptors in manganese-treated mice. *Biol Pharm Bull* 31(10):1894-1897.
- Nava-Asbell C, Paz-Bermudez F, Erlij D, Aceves J, Floran B. 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.

Navarro G, Aguinaga D, Angelats E, Medrano M, Moreno E, Mallol J, Cortes A, Canela EI, Casado V, McCormick PJ, Lluís C, Ferré S. 2016. A Significant Role of the Truncated Ghrelin Receptor GHS-R1b in Ghrelin-induced Signaling in Neurons. *J Biol Chem* 291(25):13048-13062.

Newman RP, LeWitt PA, Jaffe M, Calne DB, Larsen TA. 1985. Motor function in the normal aging population: treatment with levodopa. *Neurology*. 35(4):571-3.

Nimchinsky EA, Hof PR, Janssen WG, Morrison JH, Schmauss C. 1997. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J Biol Chem* 272(46):29229-29237.

Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, George SR. 1996. Dopamine D2 receptor dimers and receptor- blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 200–204

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Termino B., Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. 2008. Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease. *Movement Disorders Vol. 23, Suppl. 3*, pp. S548–S559.

Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ. 2017. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*. Sep;32(9):1264-1310.

Oprian DD. 1992. The ligand-binding domain of rhodopsin and other G protein-linked receptors. *J Bioenerg Biomembr*. 24(2):211-7.

Pacchiana R, Abbate M, Armato U, Dal Pra I, Chiarini A. 2014. Combining immunofluorescence with in situ proximity ligation assay: a novel imaging approach to monitor protein-protein interactions in relation to subcellular localization. *Histochem Cell Biol* 142(5):593-600.

Pagliusi S, Chollet-Daemerius A, Losberger C, Mills A, Kawashima E. 1993. Characterization of a novel exon within the D3 receptor gene giving rise to an mRNA isoform expressed in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 15;194(1):465-71.

Palakurthi B, Burugupally SP. 2019. Postural Instability in Parkinson's Disease: A Review. *Brain sciences*, 9(9), 239.

Park BH, Fishburn CS, Carmon S, Accili D, Fuchs S. 1995. Structural organization of the murine D3 dopamine receptor gene. *J Neurochem.* 64(2):482-6.

Parkinson J. 1817. *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Whittingham and Rowland Sherwood, Neely and Jones.

Pasupathy A, Miller EK. 2005. Different time courses of learning related activity in the prefrontal cortex and striatum. *Nature.* 433:873–876.

Paxinos, G. and Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*.

Pedrosa R, Gomes P, Hopfer U, Jose PA, Soares-da-Silva P. 2004. G α 3 protein-coupled dopamine D3 receptor-mediated inhibition of renal NHE3 activity in SHR proximal tubular cells is a PLC-PKC-mediated event. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287:F1059–F1066.

Perreault ML, Hasbi A, O'Dowd BF, & George SR. 2011. The dopamine D1-D2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, 5(May), 31.

Picconi B, Gardoni F, Centonze D, Mauceri D, Cenci MA, Bernardi G, Calabresi P, Di Luca M. 2004. Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J Neurosci* 24(23):5283-5291.

Pin J-P, Neubig R, Bouvier M, et al. 2007. International union of basic and clinical pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev.* 59:5–13.

Polymeropoulos MH. 1997. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276(5321): 2045-2047.

Prieto GA. 2017. Abnormalities of Dopamine D3 Receptor Signaling in the Diseased Brain. *J Cent Nerv Syst Dis* 9:1179573517726335.

Prieto GA, Perez-Burgos A, Palomero-Rivero M, Galarraga E, Drucker-Colin R, Bargas J. 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 LM, Logue AD, Taylor BC, Ahlbrand R, Welge JA, Tang Y, Sharp FR, Richtand NM. 2006. Relative expression of D3 dopamine receptor and alternative splice variant D3nf mRNA in high and low responders to novelty. *Brain Res Bull* 70(4-6):296-303.

Pugsley TA, Davis MD, Akunne HC, MacKenzie RG, Shih YH, Damsma G, Wikstrom H, Whetzel SZ, Georgic LM, Cooke LW, et al. 1995. Neurochemical and functional characterization of the preferentially selective dopamine D3 agonist PD 128907. *J Pharmacol Exp Ther* 275(3):1355-1366.

Rangel-Barajas C, Coronel I, Floran B. 2015. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis* 6(5):349-368.

Rangel-Barajas C, Silva I, Garcia-Ramirez M, Sanchez-Lemus E, Floran L, Aceves J, Erlij D, Floran B. 2008. 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [(3)H]-GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 55(5):704-711.

Rangel-Barajas C, Silva I, Lopez-Santiago LM, Aceves J, Erlij D, Floran B. 2011. L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiology of disease* 41(1):51-61.

Richtand NM, Goldsmith RJ, Nolan JE, Berger SP. 2001. The D3 dopamine receptor and substance dependence. *J Addict Dis*. 20(3):19-32.

Richtand NM, Woods SC, Berger SP, Strakowski SM. 2001. D3 dopamine receptor, behavioral sensitization, and psychosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 25(5):427-43.

Richtand NM, Pritchard LM and Coolen LM. 2005. Dopamine Receptor Alternative Splicing. In: Schmidt WJ, Reith M.E.A. (eds) *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*. Humana Press. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-59259-852-6_2.

Richtand NM. 2006. Behavioral sensitization, alternative splicing, and d3 dopamine receptor-mediated inhibitory function. *Neuropsychopharmacology* 31(11):2368-2375.

Richtand NM, Liu Y, Ahlbrand R, Sullivan JR, Newman AH, McNamara RK. 2010. Dopaminergic regulation of dopamine D3 and D3nf receptor mRNA expression. *Synapse* 64(8):634-643.

Richtand NM, Kelsoe JR, Segal DS, Kuczenski R. 1995. Regional quantification of D1, D2, and D3 dopamine receptor mRNA in rat brain using a ribonuclease protection assay. *Brain Research Molecular Brain Research*. 33(1):97-103.

Rico AJ, Dopeso-Reyes IG, Martinez-Pinilla E, Sucunza D, Pignataro D, Roda E, Marin-Ramos D, Labandeira-Garcia JL, George SR, Franco R, Lanciego JL. 2017. Neurochemical evidence supporting dopamine D1-D2 receptor heteromers in the striatum of the long-tailed macaque: changes following dopaminergic manipulation. *Brain Struct Funct* 222(4):1767-1784.

Ridray S, Griffon N, Mignon V, Souil E, Carboni S, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P. 1998. Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci* 10(5):1676-1686.

Rivero-Müller A, Jonas KC, Hanyaloglu AC, et al. 2013. Di/oligomerization of GPCRs-mechanisms and functional significance. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 117:163–185.

Robertson HA. 1992. Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 15(6):201-206.

Rodriguez-Sanchez M, Escartin-Perez RE, Leyva-Gomez G, Avalos-Fuentes JA, Paz-Bermudez FJ, Loya-Lopez SI, Aceves J, Erlij D, Cortes H, Floran B. 2019. Blockade of Intranigral and Systemic D3 Receptors Stimulates Motor Activity in the Rat Promoting a Reciprocal Interaction among Glutamate, Dopamine, and GABA. *Biomolecules* 9(10).

Rommelfanger KS, & Wichmann T. 2010. Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, 4, 139.

Ronduo P. 2010. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties, *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1971–1986.

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

Salles MJ, Herve D, Rivet JM, et al. 2013. Transient and rapid activation of Akt/GSK-3 β and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem.* 125:532–544.

Sampedro F, Marín-Lahoz J, Martínez-Horta S, Pagonabarraga J, Kulisevsky J. 2019. Reduced gray matter volume in cognitively preserved COMT¹⁵⁸Val/Val Parkinson's disease patients and its association with cognitive decline. *Brain Imaging Behav.* doi: 10.1007/s11682-018-0022-y.

- Sato Y, Kikuyama M, Oizumi K. 1997. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in Parkinson's disease. *Neurology*. 49(5):1273-8.
- Scarselli M, Novi F, Schallmach E, et al. 2001. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem*. 276:30308–30314.
- Schmauss C, Haroutunian V, Davis KL, Davidson M. 1993. Selective loss of dopamine D3-type receptor mRNA expression in parietal and motor cortices of patients with chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:8942–8946.
- Schmauss C. 1996. Enhanced cleavage of an atypical intron of dopamine D3-receptor pre-mRNA in chronic schizophrenia. *J Neurosci* 16(24):7902-7909.
- Schmitz J, van der Mey D, Bermudez M, et al. 2014. Dualsteric muscarinic antagonists–orthosteric binding pose controls allosteric subtype selectivity. *J Med Chem*. 57:6739–6750.
- Schwartz JC, Ridray S, Bordet R, Diaz J, Sokoloff P. 1998. D1/D3 receptor relationships in brain coexpression, coactivation, and coregulation. *Adv Pharmacol* 42:408-411.
- Seidl SE, Santiago JA, Bilyk H, Potashkin JA. 2014. The emerging role of nutrition in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 7;6:36.
- Seger CA. 2006. The basal ganglia in human learning. *Neuroscientist*. 12:285–290.
- Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B. 1994. Modulation of Ca²⁺ channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *Journal of Neurosciences* 14(11 Pt 2):7109-7116.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 86:353–358.
- Smith Y. & Villalba R. 2008. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Movement disorders; official journal of the Movement Disorder Society*, 23 Suppl 3, S534–47.
- Smith LN, Bachus SE, McDonald CG, Smith RF. 2015. Role of the D3 dopamine receptor in nicotine sensitization. *Behav Brain Res* 289:92-104.
- Snyder LA, Roberts JL, Sealfon SC. 1991. Alternative transcripts of the rat and human dopamine D3 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 31;180(2):1031-5.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Bouthenet ML, Souil E, Schwartz JC. 1992. Localization and function of the D3 dopamine receptor. *Arzneimittelforschung*. 42(2A):224-30.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347(6289):146-151.

Sokoloff P, Le Foll B. 2017. The dopamine D3 receptor, a quarter century later. *Eur J Neurosci* 45(1):2-19.

Spano PF, Govoni S, Trabucchi M. 1978. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155–165.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*. 63:101-32.

Strader CD, Dixon RA, Cheung AH, Candelore MR, Blake AD, Sigal IS. 1987. Mutations that uncouple the beta-adrenergic receptor from Gs and increase agonist affinity. *J Biol Chem*. 5;262(34):16439-43.

Stanwood GD, Artymyshyn RP, Kung MP, Kung HF, Lucki I, McGonigle P. 2000. Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [(125)I]7-OH-PIPAT: evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 295(3):1223-1231.

Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST. 1992. Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10178-10182.

Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z. 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16(20):6579-6591.

Swant J, Stramiello M, Wagner JJ. 2008. Postsynaptic dopamine D3 receptor modulation of evoked IPSCs via GABA(A) receptor endocytosis in rat hippocampus. *Hippocampus*. 18:492–502.
Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H. 1990. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 265(8):4315-4320.

Thomsen ARB, Plouffe B, Cahill TJ, et al. 2016. GPCR-G protein- β -arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling. *Cell*. 166:907–919.

Torvinen M, Marcellino D, Canals M, et al. 2005. Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Mol Pharmacol*. 67:400–407.

Trevitt JT, Carlson BB, Nowend K, Salamone JD. 2001. Substantia nigra pars reticulata is a highly potent site of action for the behavioral effects of the D1 antagonist SCH 23390 in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 156(1):32-41.

Tysnes OB, Storstein A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*. 124(8):901-905.

Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Dias JA, et al. 2014. Mutations in G protein-coupled receptors that impact receptor trafficking and reproductive function. *Mol Cell Endocrinol*. 382:411–423.

Wang C-IA, Lewis RJ. 2013. Emerging opportunities for allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Biochem Pharmacol*. 85:153–162.

Wang ZZ, Hardy SF, Hall ZW. 1996. Assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. The first transmembrane domains of truncated alpha and delta subunits are required for heterodimer formation in vivo. *J Biol Chem*. 1;271(44):27575-84

Wells GJ. 2014. Allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *Curr Top Med Chem*. 14:1735–1737.

Windels F, Kiyatkin EA. 2004. GABA, not glutamate, controls the activity of substantia nigra reticulata neurons in awake, unrestrained rats. *J Neurosci* 24(30):6751-6754.

Wise H. 2012. The roles played by highly truncated splice variants of G protein-coupled receptors. *J Mol Signal* 7(1):13.

Whorton MR, Jastrzebska B, Park PS-H, et al. 2008. Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J Biol Chem*. 283:4387–4394.

Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SGF, et al. 2007. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:7682–7687.

Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, Moratalla R, Cooper DC, Hu XT, White NM, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S. 1997. Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron* 19:837–848.

Yahr MD, Duvoisin RC, Shear MJ, Barrett RE, Hoehn MM. 1969. Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch Neurol.* 21(4):343-354.

Zawarynski P, Talerico T, Seeman P, Lee SP, O'Dowd BF, George SR. 1998. Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett.* 441:383– 6.

Zaworski PG, Alberts GL, Pregoner JF, Im WB, Slightom JL, Gill GS. 1999. Efficient functional coupling of the human D3 dopamine receptor to G(o) subtype of G proteins in SH-SY5Y cells. *Br J Pharmacol.* 128:1181–1188.

Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 44(4):601-7.