



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11281
33

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

"CARACTERIZACION DE LA MODULACION DEL PATRON DE DISPARO DE LA NEURONA ESPINOSA MEDIANA DEL NEOESTRIADO, POR ACTIVACION DEL RECEPTOR DOPAMINERGICO TIPO D2"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :

ENRIQUE PEREZ GARCIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

MEXICO, D. F.

...izo a la Direccion General de Bibliotecas UNAM a difundir en formato electronico el contenido de mi trabajo recepi.

2003

NOMBRE: Enrique Perez Garcia

FECHA: 31 de Julio de 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

A

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Dedico esta tesis con gran cariño a mis padres Nuria y Enrique, así como a mi hermano Santiago.

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco profundamente a la Dra. Elvira Galarraga Palacio por su excelente tutoría a lo largo de mis estudios de doctorado. Este agradecimiento es extensivo al Dr. José Bargas Díaz quien siempre estuvo cerca en mi formación académica. ¡Mil gracias!

A los sinodales de esta tesis: Dr. Jorge Aceves Ruíz, Dr. Gabriel Cota Peñuelas, Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, Dra. Martha Pérez Armendariz, Dra. María Corsi Cabrera y Dr. Arturo Hernández Cruz; por los comentarios y sugerencias a este trabajo.

A la Dra. Marcia Hiriart por revisar este manuscrito.

A Elizabeth Hernández Echeagaray por su amistad y gran ayuda en la redacción de esta tesis.

A Dagoberto Tapia, porque además de realizar el trabajo anatómico descrito en esta tesis, siempre estuvo dispuesto a enseñarme y ayudarme en cualquier aspecto relacionado con el trabajo de laboratorio. Y claro, ¡¡ como olvidar las comilonas en San Andrés Jaltenco!!

A mis compañeros y amigos del instituto Alejandra Figueroa, Emilio Galván, Cesar Casasola, Eduardo Calixto, Tamara Pérez, Carmen Vilchis, Ramiro Vergara, Antonio Laville, Jaime Napoleón, Humberto Salgado (¡gracias Betito por la ayuda!), Ernesto Mendoza y Fernando Peña.

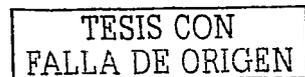
A la banda de Psicología: Vladimir e Hilda, Yola, Gaby Castillo, Gaby Orozco, Rubén, Oscar Zamora y Oscar Galicia.

A las infaltables: Karina (Juan, Joaquín, Daniela), Tanchi (Miguel y Santiago) y Sheyla (?).

Los amigos añejos: Inti, Dago, Julia, Gino, Nuria, Paty y Gil.

¡Y a ti Perlita!

C



El presente trabajo se realizó en el departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Elvira Galarraga Palacio.

A lo largo del Doctorado conté con una Beca-Crédito otorgada por CONACyT (No. de registro 138069), así como con una beca complementaria asignada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (D.G.E.P.) de la U.N.A.M.

0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.	i
RESUMEN.	ii
SUMMARY.	iii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Ganglios basales: consideraciones anatómicas.	1
1.2 El neoestriado.	4
1.3 Receptores dopaminérgicos.	6
1.3.1 Estructura genética.	6
1.3.2 Estructura proteica.	8
1.3.3 Farmacología.	11
1.3.4 Localización celular en el neoestriado.	13
1.3.5 Transducción de señales.	16
1.4 El patrón temporal de disparo de la neurona espinosa mediana.	20
1.4.1 Biestabilidad de la neurona espinosa mediana.	20
1.4.2 Modulación dopaminérgica de la respuesta postsináptica excitadora.	23
1.4.3 Regulación dopaminérgica del patrón de disparo a través de otras conductancias.	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	28
3. OBJETIVOS.	30
4. MÉTODO.	31
4.1 Obtención de las rebanadas de cerebro.	31
4.2 Registros electrofisiológicos.	31

E

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3 Desarrollo de cada experimento.	32
4.4 Fármacos.	33
4.5 Procesamiento de datos.	34
5. RESULTADOS.	35
APARTADO 1. La activación de los receptores dopaminérgicos tipo D2 reduce la excitabilidad de la neurona espinosa mediana. (Se anexa primer artículo; Hernández-López et al., 2000).	37
APARTADO 2. El papel de las diferentes conductancias de calcio en el disparo repetitivo de la neurona espinosa mediana; implicaciones para la modulación de los receptores dopaminérgicos tipo D2. (Se anexa segundo artículo; Pérez-Garci et al., 2003).	46
APARTADO 3. Interacción funcional entre los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en la neurona espinosa mediana.	53
6. DISCUSIÓN.	64
6.1 Efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D2 sobre el patrón de disparo de la neurona espinosa mediana.	64
6.2 Acciones opuestas de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en el disparo de la neurona espinosa mediana.	65
6.3 Antagonismo dopaminérgico en la modulación de las conductancias de calcio tipo L.	66
6.4 Antagonismo D1-D2 en una misma neurona espinosa mediana.	70
6.5 Implicaciones fisiológicas de la modulación dopaminérgica vs. la colinérgica.	71
7. BIBLIOGRAFÍA.	75

ABREVIATURAS.

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiónico
AMPc	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
AVT	Área ventral tegmental
DA	Dopamina
DARP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (32,000 daltones)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios Basales
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
I-F	Curva función intensidad-frecuencia
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
K_i	Constante de inhibición
LCEA	Líquido cerebroespinal artificial
NE	Neostriado
NEM	Neurona espinosa mediana
NMDA	N-metil-D-asparato
NST	Núcleo subtalámico
PKA	Proteína cinasa Dependiente de AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PP-1	Proteína fosfatasa-1
PPH	Postpotencial hiperpolarizante
SNc	Sustancia nigra compacta
SNr	Sustancia nigra reticulada
TEA	Cloruro de tetraetilamonio

RESUMEN.

La dopamina ejerce sus acciones sobre las neuronas espinosas medianas (NEM) del neocórtico a través de dos familias de receptores: la familia D1 y la D2. La activación de los receptores D1 aumenta las corrientes de calcio tipo L evocando la generación de mesetas despolarizantes que facilitan el disparo repetitivo de la NEM. El papel de los receptores D2 en la regulación del disparo de estas células se desconoce. En esta tesis describo el efecto del quinpirol y el quinloran (agonistas de los receptores D2), en la excitabilidad de la NEM. Para ello registré intracelularmente NEM en rebanadas cerebrales de rata, en la modalidad de fijación de corriente.

Los agonistas D2 abolieron la generación de mesetas despolarizantes espontáneas e inducidas por el agonista de los canales de calcio tipo L, BAY-K 8644 (2.5 μ M), lo que redujo la frecuencia de disparo en un 40%. Los agonistas D2 también redujeron en un 25% la duración del potencial de calcio obtenido con TEA (20mM). Estos efectos fueron ocluidos por nifedipina (2.5 μ M). Estas acciones son opuestas a las de los receptores D1 y se deben a una reducción en las conductancias de calcio tipo L debida a la activación de la fosfatasa calcineurina, a través de la vía fosfolipasa C β 1-Inositol 1,4,5-trifosfato.

Por otro lado, los agonistas D2 revirtieron el aumento provocado por los receptores D1 en la generación de las mesetas despolarizantes, la frecuencia de disparo y la duración del potencial de calcio. Sin embargo, el agonista D1 no revertió la acción de los receptores D2, evidenciando una asimetría funcional en la interacción D1/D2. El 100% de las NEM respondió al agonista D1 mientras que el 85% tuvo respuesta a los agonistas D2. Sólo un alto nivel de coexpresión de receptores de ambas familias podría explicar estos resultados.

SUMMARY.

Dopamine acts on neostriatal medium spiny neurons (MSN) through both: D1-like and D2-like family receptors. Activation of D1-like receptors increases L-type calcium currents evoking depolarising plateaus which facilitate the repetitive firing. The role D2-like receptors play in modulating the firing properties of these neurons remains unknown. In this doctoral thesis, I describe the effect of two D2-selective agonists, quinpirole and quinlorane ($5\mu\text{M}$), on MSN excitability. To achieve this, I performed intracellular recordings in rat brain slices in the current-clamp modality.

D2 receptor stimulation abolished the generation of both, spontaneous and BAY-K 8644 ($2.5\mu\text{M}$)-induced depolarising plateaus, which rendered in a 40% reduction in the firing frequency. D2 agonists also shortened in a 25% the duration of calcium dependent action potentials induced by TEA (20mM). Nicardipine ($2.5\mu\text{M}$) occluded these effects. These D2-responses are opposite to those already described for D1 receptors. A novel phospholipase C β 1-Inositol 1,4,5-triphosphate-calcineurin-signaling cascade accounts for the L-type calcium conductance reduction.

On the other hand, D2 agonists reverted the D1 augmentation observed in: depolarising plateaus generation, firing frequency and calcium dependent action potentials. Surprisingly, the D1 agonist SKF-81297 ($1\mu\text{M}$) was always ineffective in reverting the established D2 effect. These results put in evidence a functional asymmetry in the D1/D2-receptor interaction. Finally, 100% of MSN responded to the selective D1-class receptor agonist SKF-81297, whereas 85% of MSN responded to the selective D2-class receptor agonists. Only a high level of co-expression of functional receptors from both dopamine receptor classes may explain our results.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Ganglios basales: consideraciones anatómicas.

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales altamente conectados entre sí, que abarcan el telencéfalo, el diencefalo y el mesencéfalo de los mamíferos, reptiles y aves. Su grado de semejanza entre diferentes especies, así como su considerable tamaño (sobre todo en los mamíferos), hace pensar que esta organización de estructuras neuronales cumple funciones esenciales en el *modus operandi* del cerebro en los vertebrados terrestres (para una revisión ver Reiner et al., 1998).

Los GB han sido implicados principalmente en la regulación de funciones motrices. La evidencia más dramática de este papel funcional se observa en la sintomatología clínica de diferentes desórdenes neurodegenerativos, en los que la integridad de dichos núcleos se ve comprometida, como las enfermedades de Parkinson y de Huntington (Albin et al., 1989). Los GB han sido también relacionados con procesos más complejos como el aprendizaje de patrones motores, así como con funciones cognitivas superiores (para extensas revisiones ver Kimura y Graybiel, 1995; Schultz, 1998; Miller y Wickens, 2000; Perkel y Farries, 2000).

Se han publicado diferentes monografías en las que se describe la intrincada conexión anatómica y funcional de los GB (ver por ejemplo Albin et al., 1989; Parent y Hazrati, 1995; Mink, 1996; Smith et al., 1998; Yelnik, 2002). A continuación se ofrece un resumen realizado a partir de estas revisiones.

La mayor parte de las aferencias que reciben los GB convergen en tres estructuras, los núcleos caudado y putamen; el núcleo acumbens; y el núcleo subtálmico (figura 1):

1) Los núcleos caudado y putamen. Estos dos núcleos comparten la misma organización celular, por lo que comúnmente son considerados como uno sólo: el estriado. Incluso en mamíferos menores, como los roedores, el estriado está constituido en una sola entidad, aunque en otros como los primates, el caudado y el putamen se encuentran

divididos por el haz de fibras que constituye la cápsula interna. Al estriado llegan aferencias glutamatérgicas provenientes principalmente de la corteza cerebral así como de los núcleos intralaminares del tálamo. La entrada de información cortical al estriado permite dividir a este último en dos territorios, uno sensorio-motor y uno asociativo. El

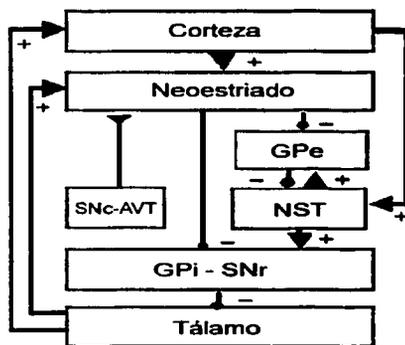


Figura 1. Diagrama simplificado de la conectividad de los ganglios basales (GB). En el neostriado convergen aferencias de la corteza y el tálamo junto con aferencias dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc) y del área ventral tegmental (AVT). Las neuronas de proyección del neostriado proyectan hacia otros núcleos de los GB: globo pálido interno (GPI), sustancia nigra reticulada (SNr) y el globo pálido externo (GPe). Este último establece conexiones recíprocas con el núcleo subtalámico (NST). El NST, que también recibe aferencias de la corteza, proyecta hacia la SNr. La SNr proyecta hacia el tálamo y a otras estructuras del tallo cerebral (no mostradas).
 + vías glutamatérgicas/aspartato
 - vías GABAérgicas

primero se localiza principalmente en el putamen y recibe proyecciones bilaterales de la corteza motora en una modalidad divergente-somatotópica así, mediante el uso de trazadores anterógrados se han podido definir tres bandas longitudinales en el estriado del primate, cada una con una representación diferente de la corteza. La pierna, el brazo y la cara son representados en el estriado en un sentido lateral-medial. En cada una de estas regiones convergen fibras provenientes de la corteza sensorial correspondiente a cada parte del cuerpo. Por otro lado, la región asociativa principalmente localizada en el caudado, recibe proyecciones homolaterales de las cortezas frontales, parietales, temporales y occipitales. En conclusión, las terminales nerviosas que recibe el estriado de la corteza, están organizadas en una forma compleja, abarcando desde una segregación total hasta un alto grado de superposición, lo que sugiere un procesamiento divergente y convergente de la información cortical (Selemon y Goldman-Rakic, 1985; Flaherty y Graybiel, 1991). En el estriado también coinciden fibras serotoninérgicas del núcleo dorsal del sistema de raphé, así como vías dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra compacta (SNc).

II) El núcleo acumbens. Este núcleo comparte con el estriado la misma citoarquitectura; sin embargo, las vías glutamatérgicas que llegan a él provienen principalmente del hipocampo así como de la corteza límbica, mientras que su entrada dopaminérgica proviene del área ventral tegmental (AVT). Los núcleos caudado, putamen y acumbens, considerados conjuntamente, constituyen el neostriado (NE; Wilson, 1998).

III) El núcleo subtálmico (NST). Si bien esta estructura es comúnmente considerada como un núcleo de relevo de la salida de la información neostriatal, es importante mencionar que su conectividad con la corteza (en especial con las regiones motoras del lóbulo frontal) y el tálamo, ha sido demostrada anatómica y fisiológicamente (Magill et al., 2000).

La neurona principal o de proyección del NE es la neurona espinosa mediana (NEM) y su neurotransmisor principal es el ácido γ -aminobutírico (GABA). Los axones de estas neuronas proyectan hacia otros núcleos de los GB. Tradicionalmente se han planteado dos vías eferentes que tienen su origen en dos poblaciones diferentes de NEMs. Por un lado, una vía formada por NEMs que coliberan los neuropéptidos sustancia P y dinorfina y que sus axones proyectan hacia el globo pálido interno (GPi) y/o hacia la sustancia nigra reticulata (SNr). Estas dos estructuras integrantes de los GB están conformadas principalmente por neuronas GABAérgicas que a su vez proyectan hacia el tálamo, principalmente a los núcleos ventral anterior y lateral, cuyas neuronas tálamo-corticales cierran un circuito corteza-GB-tálamo-corteza.

Otro grupo de NEMs, que se caracteriza por coliberar el neuropéptido encefalina, manda sus axones hacia el globo pálido externo (GPe) que envía proyecciones GABAérgicas al NST, cuyas neuronas glutamatérgicas proyectan de regreso al globo pálido externo y hacia los núcleos talámicos mencionados. Las dos vías han recibido los nombres de directa e indirecta, respectivamente, por su tipo de conectividad con el tálamo y otras estructuras de salida de los GB. Sin embargo, la diferenciación entre las dos vías ha sido puesta en duda por hallazgos en donde se ha demostrado que NEMs cuyos axones conformarían la vía directa, emiten también colaterales hacia el globo pálido externo

(Kawaguchi et al., 1990) y que una población considerable de NEMs coexpresa ambos neuropéptidos (Surmeier et al., 1996).

1.2 El neocstriado.

En el primate y en la rata las NEMs constituyen el 77 % y el 95 % respectivamente de la población de neuronas neocstriales (Bennett y Wilson, 2000). El diámetro somático de dichas neuronas es de 10 a 20 μm y a partir de esta estructura emergen entre 3 y 5 troncos dendríticos, cada uno de los cuales ramifica en dos procesos, que a su vez pueden ramificar una o dos veces más, abarcando un volumen esférico de 300-500 μm de diámetro. Dichas dendritas están densamente cubiertas de espinas, mismas que contribuyen con la mayor parte de la superficie total de la célula (Kawaguchi y Kubota, 1995; Bolam y Bennett, 1995; Wilson, 1998; Bennett y Wilson, 2000). Prácticamente las cabezas de todas las espinas dendríticas establecen una especialización sináptica de tipo asimétrico con terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo. Se estima que cada NEM recibe entre 12,500 y 15,000 entradas glutamatérgicas, mitad de las cuales provienen de la corteza y la otra mitad de las aferentes talámicas (Bennett y Wilson, 2000). Cada NEM recibe entre 1 y 10 sinapsis de una sola neurona cortical, por lo tanto, entre 750 y 7500 neuronas córtico-estriales inervan a una sola NEM (Wilson, 1998; Bennett y Wilson, 2000).

Los axones de las neuronas dopaminérgicas provenientes de la SNc entran al estriado formando varicosidades y estableciendo sinapsis *en passant* en prácticamente toda la superficie del estriado. Aproximadamente cada SNc de la rata contiene 8,000 neuronas dopaminérgicas mientras que cada NE contiene \approx 2.8 millones de neuronas (Oorschot, 2000), lo que resultaría en un factor de divergencia de 300-400 (Schultz, 1998). Cada axón dopaminérgico se ramifica abundantemente en un área limitada del estriado y tiene aproximadamente 500,000 varicosidades de las cuales la dopamina (DA) es liberada (Andén et al., 1966). Cada NEM recibiría en promedio 750-900 sinapsis dopaminérgicas (Bennett y Wilson, 2000).

Especializaciones sinápticas de tipo simétrico, marcadas positivamente para la enzima tirosina hidroxilasa, se han observado en las espinas dendríticas (59 %), troncos dendríticos (35 %) y en menor grado, en el soma de la NEM (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984; Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1987).

La población restante de neuronas neocorticales está conformada por interneuronas que básicamente son de tres tipos (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y Kubota, 1995; Bolam y Bennett, 1995; Wilson, 1998; Bennett y Wilson, 2000):

I) Interneuronas colinérgicas gigantes. Constituyen el 1-2 % de las neuronas del NE en la rata. Expresan la enzima acetilcolinesterasa. Su soma mide entre 50 y 60 μm de diámetro y son las de mayor tamaño en el NE. Estas interneuronas constituyen una de las mayores fuentes de acetilcolina de todo el sistema nervioso central. Sus dendritas son de tipo liso o ligeramente espinoso, abarcando un volumen de 500 μm en el eje dorsoventral y 750-1000 μm en el rostrocaudal.

II) Interneuronas inmunoreactivas a parvalbúmina. Son de naturaleza GABAérgica y expresan la enzima quelante de calcio, parvalbúmina. Su diámetro somático es de 10-30 μm . Sus dendritas son lisas en las regiones proximales y presentan varicosidades en zonas más distales al soma.

III) Interneuronas somatostatinérgicas. Estas neuronas se caracterizan por liberar somatostatina y se distinguen además por expresar la enzima óxido nítrico sintetasa involucrada en la síntesis del neuromodulador óxido nítrico. Son de tipo bipolar y su soma mide entre 10 y 20 μm de diámetro. Sus dendritas son lisas, no espinosas y rara vez ramifican.

Básicamente estos tres tipos de interneuronas reciben el mismo tipo de aferentes glutamatérgicas y dopaminérgicas, y todas ellas proyectan terminales sinápticas hacia la NEM.

El papel modulador de la DA en los GB es de suma importancia, ya que las alteraciones en su papel regulador resultan en diferentes desórdenes psicomotores. Es por este hecho, que el estudio de la actividad fisiológica ejercida por los diferentes receptores existentes para esta catecolamina, constituye el tema de trabajo de un gran número de laboratorios en todo el mundo.

1.3 Receptores dopaminérgicos.

1.3.1 Estructura genética.

Basándose en estudios de tipo bioquímico y farmacológico, Keabian y Calne (1979) propusieron la existencia de dos tipos de receptores para la DA: uno acoplado positivamente a la enzima adenilato ciclasa (AC) denominado D1 y otro que la inhibe, el D2. Posteriormente, con el empleo de técnicas de clonación, se describió la existencia de cinco tipos de receptores dopaminérgicos cuyas características fisiológicas, farmacológicas así como por su secuencia de aminoácidos, les permitían ser catalogados en alguna de las dos categorías (para revisiones ver Civelli et al., 1993; Strange, 1993; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000, Sealton y Olanow, 2000).

El primer tipo de receptor en ser clonado fue el D2, siendo su ADNc aislado con base en su homología con los receptores adrenérgicos tipo β_2 (Bunzow et al., 1988). Dicho receptor consta de una secuencia de 415 aminoácidos. Posteriormente se estableció la existencia de una isoforma alterna del receptor D2 de 444 aminoácidos derivada por procesamiento alternativo (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989). En 1990 Sokoloff y colaboradores identificaron la existencia de un nuevo receptor para la DA, hibridizando una biblioteca de DNAc del cerebro de la rata con una sonda derivada de la secuencia del receptor D2. A este nuevo receptor se le denominó D3. A partir de la biblioteca de una línea celular de neuroblastoma humano se obtuvo la clonación de los receptores denominados D4, distinguiéndose de los receptores D2 y D3 por su alta selectividad por el antipsicótico clozapina (Van Tol et al., 1991). Por poseer características farmacológicas y estructurales similares a los receptores inicialmente descritos como D2, a

todos estos receptores se les agrupó en una misma familia, la familia D2 (Civelli et al., 1993; Missale et al., 1998).

A partir de bibliotecas génicas (Dearry et al., 1990; Sunahara et al., 1990) así como del empleo de reacciones en cadena de la polimerasa, aplicadas en una línea celular de neuroblastoma (Monsma et al., 1990) y en células estriatales (Zhou et al., 1990), se clonó el receptor D1. Utilizando la secuencia de dicho receptor, se aisló el segundo miembro de esta familia al que se llamó D5 (Sunahara et al., 1991).

La existencia de dos familias de receptores dopaminérgicos sugiere la divergencia de dos familias de genes que difieren básicamente en la ausencia (familia D1) y presencia (familia D2) de intrones en su secuencia codificadora (tabla 1). La localización de intrones en la familia de genes que codifica para los receptores D2 es similar, de esta manera, el gen que codifica para los receptores D2 se caracteriza por poseer seis intrones (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989). El receptor D3 carece del cuarto intrón del receptor D2 (Sokoloff et al., 1990). El receptor D4 posee tres intrones, el primero y segundo se asemejan a los dos primeros del receptor D2, mientras que el tercero posee una configuración inusual intrón-exón, en la que se carece de los sitios donadores y aceptores de la unión "splicing" que flanquean al intrón (Van Tol et al., 1991).

La presencia de intrones en los genes codificadores de la familia D2 promueve la expresión de receptores alternativos. Como ya se mencionó, dos isoformas funcionales del receptor D2 han sido descritas, originándose por el procesamiento alternativo de un exón de 87 pares de bases entre los intrones cuatro y cinco (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989). De igual manera se ha descrito la existencia de receptores alternos D3, sin embargo, éstos no son funcionales (revisado en Missale et al., 1998). En cuanto al receptor humano D4, se han descrito diferentes variaciones polimórficas, en las que un segmento de 48 pares de bases en el tercer exón, codificador de un segmento de 16 aminoácidos en la tercera asa intracelular, puede aparecer repetido de dos a diez veces (Van Tol et al., 1992). El número de repeticiones de dicho segmento ha sido correlacionado con

diferentes rasgos de personalidad (Ebstein et al., 2000) así como con el grado de delirios psicóticos (revisado en Sealfon y Olanow, 2000).

Dos pseudogenes con un grado de homología de 95 % con el gen humano del receptor D5, codifican formas truncadas no funcionales del receptor D5 (revisado en Missale et al., 1998).

TABLA 1. *Características moleculares de los receptores dopaminérgicos*

	Familia D1		Familia D2			
	D ₁	D ₅	D ₂		D ₃	D ₄
			D _{2S}	D _{2L}		
Aminoácidos	446 (r) 446 (h)	475 (r) 477 (h)	415 (r) 414 (h)	444 (r) 443 (h)	446 (r) 400 (h)	387-515 (h)* 385 (r)
Aminoácidos en la tercera asa intracelular	57 (r) 57 (h)	50 (r) 50 (h)	135 (r) 134 (h)	444 (r) 443 (h)	166 (r) 120 (h)	101-261 (h)* 106 (r)
Aminoácidos el segmento COOH- terminal	113 (r) 113 (h)	117 (r) 116 (h)	16 (r) 16 (h)	16 (r) 16 (h)	16 (r) 16 (h)	18 (r) 18 (h)
Intrones	0	0	6		5	3

r, rata h, humano.
* El número de aminoácidos en el receptor D4 humano depende del número de repeticiones en la tercera asa intracelular

1.3.2 Estructura proteica.

Los receptores dopaminérgicos forman parte de una familia extensa de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G y están constituidos por siete dominios transmembranales (figura 2; para revisiones ver Civelli et al., 1993; Strange, 1993; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000, Sealfon y Olanow, 2000).

específica con una proteína $G_{i/o}$ que inhibe la síntesis de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc; para revisiones ver Civelli et al., 1993; Strange 1993; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000, Sealton y Olanow, 2000). Es precisamente a este nivel en donde las dos isoformas del receptor D2 se diferencian. La isoforma larga del receptor D2 se caracteriza por poseer un segmento adicional de 29 aminoácidos (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989). Esta característica podría determinar la afinidad del receptor por un tipo de proteína G específica (Montmayeur et al., 1993; Falardeau, 1994; Guiramand et al., 1995; Gardner y Strange, 1998; Usiello et al., 2000) sin embargo, los papeles funcionales de las dos isoformas son comúnmente considerados equivalentes (Usiello et al., 2000).

El segmento COOH-terminal de los receptores de la familia D1 es hasta siete veces más largo que el correspondiente de la familia D2 (ver tabla1; para revisiones ver Civelli et al., 1993; Strange, 1990 y 1993; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000, Sealton y Olanow, 2000). Este segmento contiene un residuo de cisteína común en los receptores acoplados a proteínas G y que, al igual que los receptores β -adrenérgicos y la rodopsina, podría contar con un grupo palmitato, que funge como punto de anclaje a la membrana celular (revisado en Strange, 1990; Missale et al., 1998, Vallone et al., 2000). Al igual que la tercera asa intracelular, el extremo COOH-terminal cuenta con residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados, regulando con ello la desensibilización de los receptores dopaminérgicos (Jiang y Sibley, 1999, Ito et al., 1999; Vallone et al., 2000; Kabbani et al., 2002). Recientemente se demostró que el segmento COOH del receptor D5 puede interactuar con la segunda asa intracelular de la subunidad $\gamma 2$ del receptor a $GABA_A$, estableciendo relaciones funcionales complejas (Liu et al., 2000).

El segmento NH_2 terminal en ambas familias está constituido por un número variable de aminoácidos (entre 20 y 39). Los receptores que constituyen a la familia D1 poseen en dicho segmento sólo un residuo de asparragina susceptible de ser glucosilado, mientras que los receptores de la familia D2 poseen tres, con excepción del D4 que posee solo uno (calculado a partir de Van Tol et al., 1991, Sunahara et al., 1991). La presencia de oligosacáridos en este segmento extracelular resulta en aumentos considerables de la masa

molecular del receptor D2, siendo de 47 a 50 kDa en su forma deglucosilizada y entre 94 y 150 KDa con la presencia de oligosacáridos (Strange, 1990).

De manera análoga a otros receptores acoplados a proteínas G, los siete segmentos transmembranales de los receptores dopaminérgicos, que estarían empacados en una forma circular siguiendo el sentido de las manecillas del reloj (visto desde el medio extracelular), formarían una hendidura accesible al agua extendiéndose de la superficie extracelular del receptor hacia el interior del dominio intramembranal (revisado en Dahl y Edvardsen, 1994; Shi et al., 2001). Los agonistas solubles en el agua ingresarían a través de esta hendidura, interactuando así con diferentes aminoácidos ubicados en las hélices alfa transmembranales, tal como ha sido planteado en estudios de mutación dirigida realizados en receptores β_2 -adrenérgicos, D2 dopaminérgicos, α_2 -adrenérgicos, M_1 muscarínicos y 5-HT_{1A} serotoninérgicos (revisado en Dahl y Edvardsen, 1994). Los grupos carboxilo de dos residuos de aspartato localizados en el segundo y tercer segmento transmembranal enlazarían el grupo amino de la dopamina, mientras que dos residuos de serina localizados en la quinta hélice transmembranal establecerían puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la estructura del catecol. Al mismo tiempo, un residuo de fenilalanina localizado en el sexto segmento intracelular podría establecer interacciones ortogonales con el anillo aromático del agonista (figura 2, revisado en Dahl y Edvardsen, 1994; Strange, 1990, 1993; Missale et al., 1998). Como resultado de esta interacción, el receptor sufre cambios conformacionales que favorecen el acoplamiento y la activación de proteínas G (Sealfon y Olanow, 2000).

1.3.3 Farmacología.

Las propiedades farmacológicas de los diferentes receptores dopaminérgicos han sido extensamente estudiadas. Ello se debe principalmente a las implicaciones terapéuticas en el tratamiento de diferentes patologías (para revisiones ver Seeman y Van Tol, 1994; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000). Si bien los resultados arrojados por estos estudios son variables, debido entre otras cosas a los diferentes tipos

celulares en donde han sido realizados (Vallone et al., 2000), diferentes hallazgos han definido el perfil farmacológico de los diferentes receptores dopaminérgicos.

Las dos familias de receptores dopaminérgicos difieren notablemente en su afinidad por diferentes ligandos. Por ejemplo, la dopamina es más afin a los receptores de la familia D2 que a la familia D1; mientras que para los primeros esta catecolamina tiene una constante de inhibición (K_i) menor a 50 nM, para los receptores D1 se ha reportado una K_i entre 0.5 y 5 μ M (Missale et al., 1998).

A la fecha no se cuenta con fármacos capaces de diferenciar entre los receptores D1 y D5, aunque se ha descrito que el receptor D5 es hasta 10 veces más sensible para la dopamina que el receptor D1 (Seeman y Van Tol, 1993). Por otro lado, los diferentes receptores que integran a la familia D2 (D2, D3 y D4), tienen afinidades similares por la dopamina (Vallone et al., 2000).

Diferentes agonistas capaces de distinguir entre las dos familias de receptores han sido sintetizados. Entre los agonistas más selectivos para la familia D2 se encuentran el quinpirole y el quinolorane (ambos fármacos fueron utilizados en este trabajo de doctorado).

El quinpirole posee una K_i de 576 nM para la isoforma D2, mientras que para la isoforma D3 es de 5.1 nM (Sokoloff et al., 1990). El quinolorane por otro lado, tiene una K_i de 341 nM para el receptor D2 y de 3.6 nM para el D3 (Foreman et al., 1989; Sokoloff et al., 1992). En este sentido, estos dos ligandos tienen hasta 100 veces mayor afinidad para la isoforma D3 en comparación con la isoforma D2. El quinpirole posee además una K_i de 46 nM para los receptores D4 (Vallone et al., 2000). A la fecha no se han podido diferenciar farmacológicamente las isoformas corta y larga del receptor D2 (Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000).

Trabajos no publicados realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que la activación de los receptores D2 por el agonista quinolorane, inhibe las corrientes de calcio

tipo L y P/Q. Al estudiarse la relación dosis-respuesta de estos efectos, se determinó una IC_{50} de 513 nM, mientras que el efecto máximo saturante se obtuvo con una concentración de 10 μ M (Salgado et al., 2002). La aplicación del antagonista selectivo para los receptores D2 sulpiride, en una concentración 1 μ M, bloqueó completamente la respuesta del quinelorane.

Dentro de los agonistas selectivos de la familia D1 se encuentra la familia de las benzazepinas, de éstas, uno de los ligandos más potentes es el SKF-81297. Este fármaco posee una K_i de 2.2 nM. y una EC_{50} de 18 nM para estimular a la enzima adenilato ciclasa. Esta misma droga posee una K_i mayor a 1 μ M para los receptores D2 (Andersen y Jansen, 1990).

1.3.4 Localización celular en el neoestriado.

A partir de la clonación de los diferentes receptores dopaminérgicos, diversos grupos de investigación han estudiado la distribución de ARNm de cada subtipo en el sistema nervioso central (para revisiones ver Meador-Woodruff et al., 1994; Sokoloff y Schwartz, 1995). Mediante el empleo de análisis de transferencia "Northern" así como de técnicas de hibridización *in situ*, se demostró la presencia de altos niveles de ARNm para ambas familias de receptores en el NE (Bunzow et al., 1988; Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989; Sokoloff et al., 1990; Dearry et al., 1990; Monsma et al., 1990; Sunahara et al., 1990; Zhou et al., 1990; Van Tol et al., 1991; Sunahara et al., 1991). Estos resultados han sido corroborados con técnicas inmunohistoquímicas dirigidas a detectar la presencia de la proteína-receptor (Ciliax et al., 1994; Ariano et al., 1995), así como con la visualización directa del sitio ligando-receptor, utilizando ligandos selectivos para cada una de las familias con marca radioactiva o fluorescente (Ariano et al., 1995).

Cada una de estas técnicas posee limitaciones en la interpretación de los datos obtenidos por su uso. Como consecuencia de ello, el estudio de la localización de los receptores dopaminérgicos a nivel celular, ha dado lugar a resultados contradictorios originando fuertes polémicas.

En 1990 Gerfen y colaboradores utilizando sondas para hibridización *in situ* en NEMs identificadas como estriado-nigrales con el uso de trazadores retrógrados, encontraron que un amplio porcentaje de estas células mostraban marca positiva para el ARNm de los receptores D1, así como para los péptidos sustancia P y dinorfina. De este grupo de neuronas, solo un pequeño porcentaje ($\approx 17\%$) presentaba marca para la sonda de receptores D2 y el neuropéptido encefalina. Resultados similares empleando la misma metodología fueron reportados por Le Moine y colaboradores en 1991.

Por otro lado, neuronas con marca positiva al neuropéptido encefalina colocalizaban con la presencia de ARNm del receptor D2. Estas neuronas constituirían presumiblemente la vía estriado-palidal (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1990).

Por su gran valor heurístico, este modelo segregacionista de la expresión de receptores dopaminérgicos en las NEMs ha sido predominante en la literatura concerniente a la fisiología de los GB. Sin embargo, otros trabajos utilizando ésta y otras metodologías, han puesto en duda el modelo y reportan niveles significativos de colocalización de ambas familias de receptores (Ariano et al., 1995).

Estas diferencias se deben básicamente a las limitaciones inherentes a la técnica de hibridización *in situ* (Ciliax et al., 1994; Ariano et al., 1995):

- Con el empleo de sondas de oligonucleótidos no se puede determinar completamente el grado de extensión a nivel celular de la expresión de receptores, como su incorporación a procesos dendríticos y axónicos distales.
- La técnica de hibridización *in situ* podría no detectar bajas cantidades de ARNm, además de que serían difíciles de visualizar en autoradiografías, soslayando con ello la expresión de proteínas funcionalmente estables.

Aunado a estas limitantes metodológicas, los trabajos de Gerfen y Le Moine sólo emplearon sondas dirigidas a detectar ARNm para los receptores D1 y D2, pero no consideraron la presencia de ARNm para cada uno de los subtipos de las dos familias.

Mediante el uso de transcripciones inversas seguidas de reacciones en cadena de la polimersa (RT-PCR) en células únicas disociadas, Surmeier y colaboradores (1993a y 1996; para una revisión ver también Nicola et al., 2000) demostraron que neuronas con niveles detectables de sustancia P pero no encefalina (45.71 % de su muestra de neuronas; n = 35), expresaban abundante ARNm del receptor D1. Una subpoblación considerable de este grupo co-expresaba ARNm para los receptores D2 (19 %) D3 (38 %) ó D4 (25 %). Neuronas con ARNm para encefalina pero no para sustancia P (25.71 % de su muestra de neuronas; n = 35), expresaban niveles abundantes de ARNm para los receptores D2 (isoformas corta y larga) y una subpoblación de este grupo (10-25 %) coexpresaba ARNm para las isoformas D1 y D5. Finalmente, estos autores también describen la presencia de una población de NEMs (28.71 % de su muestra de neuronas; n = 35) con niveles detectables de ARNm para ambos péptidos. Este grupo se caracterizó por coexpresar ARNm abundante para los receptores D1 y D2 y varias de las isoformas de cada una de las dos familias.

Estudiando la modulación de corrientes iónicas por la aplicación de agonistas dopaminérgicos selectivos para cada familia de receptores, Surmeier y colaboradores (1996) demostraron también que las NEMs expresaban proteínas-receptores funcionales, aun cuando los niveles de ARNm detectados posteriormente en la célula eran bajos.

Por otro lado, visualizando anticuerpos específicos con marca fluorescente para los receptores D1 y D2 con microscopía confocal de alta resolución, Aizman y colaboradores (2000) demostraron que ambos tipos de receptores se encuentran colocalizados en virtualmente todas las NEMs, tanto en preparaciones en cultivo como en rebanadas de cerebro. Estos resultados han sido corroborados por David y Harrison (2002) quienes reportaron que un 80 % de NEMs en rebanadas de cerebro coexpresan receptores D1 y D2.

Diferentes estudios funcionales utilizando agonistas selectivos para las dos familias de receptores, han descrito respuestas D1 y D2 que serían difíciles de interpretar si estos receptores no estuvieran colocalizados en la misma célula. Este es el caso de varios de los resultados que se mostrarán en el presente trabajo de tesis.

La expresión de receptores dopaminérgicos en los tres tipos de interneuronas del NE, no ha sido estudiada en detalle debido principalmente a su escaso número en el NE (Nicola et al., 2000). Trabajos de hibridación *in situ* demostraron la presencia de ARNm para los receptores D2 pero no D1, en interneuronas colinérgicas gigantes (Le Moine et al., 1990). Posteriormente, la aplicación de RT-PCR en estas neuronas demostró la expresión de receptores D2 (en sus dos isoformas), pero además reveló la presencia de receptores D5 en virtualmente todas las interneuronas colinérgicas (Yan et al., 1997; Yan y Surmeier, 1997; Nicola et al., 2000).

1.3.5 Transducción de señales.

Como muchos otros receptores acoplados a proteínas G, la activación de los receptores dopaminérgicos promueve la generación de diferentes cascadas de señalización intracelular que tendrán como objeto mediar diferentes aspectos fisiológicos de la célula.

Desde finales de los años setenta era claro que cada una de las dos familias de receptores dopaminérgicos, promovían efectos antagónicos sobre la proteína adenilato ciclasa (Kebabian y Calne, 1979). Con la clonación de los receptores D1 y su posterior transfección en diferentes líneas celulares, se demostró que su activación promovía aumentos considerables en los niveles de AMPc (revisado en Missale et al., 1998), este efecto estaría mediado principalmente por proteínas G_s , aunque también se ha descrito la mediación de proteínas $G_{\alpha f}$ (Hervé, 1995). Por el contrario, la activación por DA de los receptores D2 disminuía los niveles de AMPc en células de la pituitaria, este efecto es principalmente mediado por proteínas $G_{i/o}$ sensibles a la toxina pertusis (Vallar y Meldolesi, 1989).

La utilización de agonistas selectivos para cada una de las dos familias de receptores permitió corroborar la presencia de estos eventos en una extensa variedad de tipos celulares, incluidas neuronas del sistema nervioso central y especialmente en la NEM del NE (revisado en Missale et al., 1998; ver figura 3).

Al igual que otras células eucariotas, el principal blanco del AMPc en las NEMs es la subunidad reguladora de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA; Surmeier et al., 1995a,b). A su vez, la subunidad catalítica de la PKA actuará fosforilando diferentes proteínas regulando con ello su actividad. Entre estas proteínas se encuentran canales iónicos como el canal de calcio tipo L que, al ser fosforilado directamente por la PKA, cambia su estado conformacional aumentando la probabilidad de apertura y por ende la conductividad del ión calcio (Surmeier et al., 1995a,b). De manera paralela, también se ha descrito que la activación de los receptores D1 promueve la disminución de las corrientes de calcio N y P. Este efecto es mimetizado por análogos de AMPc y bloqueado por inhibidores de la PKA y el inhibidor de fosfatasas, el ácido okadáico (Surmeier et al., 1995a,b). El modelo propuesto en este caso, es que la actividad de la PKA activaría a la proteína fosfatasa-1 (PP-1). Con ello, PP-1 desfosforilaría los canales N y P que pasarían a un estado no conductivo (Surmeier et al., 1995a,b). Sin embargo, esta posibilidad no ha sido demostrada experimentalmente en la NEM.

La activación selectiva de receptores D1 promueve también la reducción de corrientes de sodio en NEMs. Este efecto es mimetizado por análogos de AMPc (Surmeier y Kitai, 1993b) y se debe a la fosforilación directa del canal por la PKA (revisado en Nicola et al., 2000). Cabe mencionar que en neuronas piramidales de la corteza prefrontal, la activación de receptores D1 disminuye selectivamente (por la vía AMPc-PKA-canal) las corrientes inactivantes rápidas de sodio (atribuidas a los canales Nav1.6), pero no las corrientes persistentes de ese mismo ión (atribuidas a los canales Nav1.1 y 1.2; Maurice et al., 2001).

Otro blanco para la vía de señalización de los receptores D1, son los canales de potasio activados a potenciales de membrana hiperpolarizados (< -80 mV) y que median la

rectificación anómala de la NEM (atribuida principalmente a la presencia de canales Kir2.2 y 2.3; Nisenbaum y Wilson, 1995; Mermelstein et al., 1998). La activación de los receptores D1 incrementa la rectificación de la célula (Pacheco-Cano et al., 1996, ver también Nicola et al., 2000). Adicionalmente, se ha demostrado que el uso de agonistas selectivos para los receptores D1 disminuye corrientes de potasio salientes de inactivación lenta (I_{As}) activadas por la despolarización de la NEM, sin embargo, estos efectos fueron atribuidos principalmente a un efecto alostérico o bloqueo directo sobre el canal, más que a una vía de señalización mediada por AMPc (Nisenbaum et al., 1998).

De manera paralela, la subunidad catalítica de la PKA también fosforila a la proteína citosólica DARP-32, una fosfoproteína de 32,000 daltones de peso, regulada por dopamina y AMPc (Nishi et al., 1997; Fienberg et al., 1998; Greengard et al., 1998). En su forma fosforilada, DARP-32 constituye un potente inhibidor de la proteína PP-1, favoreciendo la permanencia en el estado fosforilado de las diferentes proteína efectoras entre las que se encuentran los canales de calcio tipo L (ver figura 3; Surmeier et al., 1995a,b; Nishi et al., 1997; Greengard et al., 1998 y 1999).

El estudio de las vías de señalización generadas por activación de los receptores D2 en células de la pituitaria, ha demostrado que junto con la inhibición de la proteína adenilato ciclasa, los receptores D2 inhiben también la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato por la proteína fosfolipasa C, disminuyendo consecuentemente los niveles de los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol. Estos eventos, aunados a la activación de una corriente saliente de potasio que hiperpolariza el potencial de membrana de la célula, median la inhibición de la secreción de prolactina que se observa en presencia de DA (Vallar y Meldolesi, 1989).

En NEMs del NE, la activación selectiva de los receptores D2 disminuye el nivel basal de fosforilación de la proteína DARP-32 además de revertir el aumento en la fosforilación de esta proteína, inducida previamente por los receptores D1, forskolina (un activador de la enzima adenilato ciclasa), así como por análogos del AMPc (Nishi et al., 1997). La acción de los receptores D2, es dependiente del calcio intracelular y es bloqueada

por la inhibición de la proteína fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina (PP2-B), lo que sugiere que la activación de estos receptores provoca un aumento en los niveles intracelulares de calcio y, por consiguiente, la activación de la calcineurina, la cual desfosforila a la DARP-32 (ver figura 3; Nishi et al., 1997). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la activación de los receptores D2 estimula el aumento en los niveles de calcio intracelular no han sido descritos (Greengard et al., 1999).

La activación de los receptores D2 en cultivos primarios de neuronas estriatales induce una potenciación en la liberación de ácido araquidónico mediada por calcio (Schinelli et al., 1994). Sin embargo, no se ha descrito que esta vía de señalización regule alguna conductancia iónica.

En interneuronas colinérgicas del NE la activación de los receptores dopaminérgicos D2 redujo significativamente las corrientes de calcio tipo N. Este efecto fue mediado por una vía delimitada a membrana con la mediación de una proteína $G_{i/o}$ no regulada por PKC (Yan et al., 1997).

La incidencia directa de estas vías de señalización sobre los diferentes canales iónicos de la NEM, permite a la DA modular importantemente la excitabilidad de la célula.

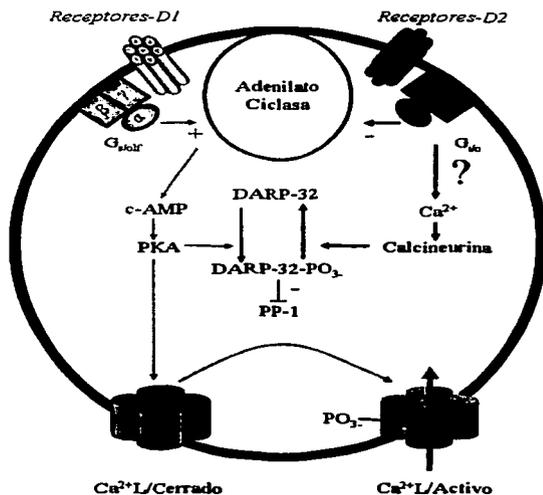


Figura 3. Vías de señalización asociadas a la activación de las familias de receptores D1 y D2. Los receptores tipo D1 estimulan la fosforilación de diferentes proteínas efectoras (eg. el canal de Ca^{2+} tipo L) a través de una vía AMPc/PKA. La PKA también fosforila a DARP-32 convirtiéndola en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa-1 (PP-1). Este efecto favorece la permanencia del canal en el estado fosforilado. Por el contrario, la activación de los receptores D2 está asociada a un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, el cual activa la fosfatasa calcineurina, misma que desfosforila a DARP-32 deshiniendo así a PP-1. Los mecanismos por los cuales los receptores D2 aumentan el calcio intracelular se desconocen. Basado en Greengard et al. (1999).

1.4 El patrón temporal de disparo de la neurona espinosa mediana.

1.4.1 Biestabilidad de la neurona espinosa mediana.

Para entender el papel funcional que juega cada una de las dos familias de receptores dopaminérgicos en la respuesta de disparo de la NEM, es primordial revisar la conducta electrofisiológica de estas células en preparaciones *in vivo*.

Estudios conductuales realizados en monos y en ratas, han demostrado que neuronas estriatales (presumiblemente NEMs) aumentan de manera fásica su patrón de disparo durante la realización de movimientos, así como durante la presentación de pistas sensoriales que indican al animal el momento de realizar la conducta (revisado en Wilson, 1993; Kiyatkin y Rebec, 1996; Cepeda y Levine, 1998; Nicola et al., 2000).

Registros intracelulares de NEMs realizados en ratas inmovilizadas y anestesiadas localmente (Wilson y Groves, 1981) y con uretano (Wilson, 1993), han mostrado que su potencial de membrana fluctúa entre dos niveles; uno hiperpolarizado (≈ -80 mV) al que se le ha denominado “down-state” y otro relativamente despolarizado (≈ -50 mV), cercano al umbral de disparo de estas células (≈ -45 mV), llamado “up-state” (ver figura 4).

El límite de cada uno de estos dos estados está delineado por la presencia de conductancias rectificadoras de potasio: una corriente rectificadora entrante ($I_{K_{ir}}$) determina el estado hiperpolarizado, mientras que una corriente rectificadora saliente (principalmente I_A) activada a partir de -60 mV, estaciona el potencial de membrana en valores subumbrales (Galarraga et al., 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995). La activación de estas dos

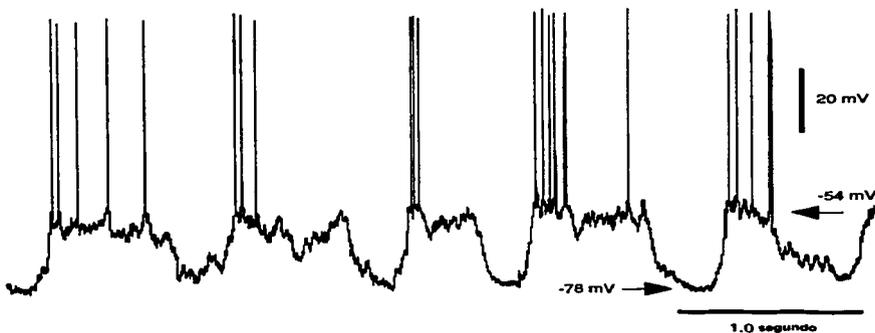


Figura 4. Fluctuaciones espontáneas del potencial de membrana de una NEM registrada intracelularmente *in vivo*. La generación de potenciales de acción ocurre durante el periodo de relativa despolarización subumbral, como resultado de pequeñas fluctuaciones en el potencial de membrana. Estos periodos son interrumpidos por transiciones hacia un estado más polarizado, cercano al potencial de inversión del ión potasio. Tomada de Stern et al. (1997).

conductancias disminuye la resistencia de entrada de la NEM. Este efecto se refleja como una disminución en la pendiente de la curva función corriente-voltaje, a lo largo del rango de voltaje en la que cada una está activa (Galarraga et al., 1994; Nisenbaum y Wilson, 1995).

La transición entre los dos estados en el comportamiento biestable de la NEM depende fuertemente de la entrada sináptica excitadora que recibe (Wilson y Groves, 1981; Wilson, 1993; Nisenbaum y Wilson, 1995; Wilson y Kawaguchi, 1996). De esta manera, un comando cortical convergente y con un grado de coherencia temporal capaz de compensar la baja resistencia de entrada que caracteriza al estado hiperpolarizado (debido a las corrientes rectificadoras anómalas), hará transitar el potencial de membrana hacia el estado despolarizado, en donde puede permanecer por tiempos variables (0.1-3 segundos). Así, pequeñas fluctuaciones en el potencial de membrana determinarán la generación o no de potenciales de acción. Entradas sinápticas corticales más débiles y desincronizadas temporalmente, serán incapaces de mantener el estado despolarizado provocando la transición al estado hiperpolarizado.

La realización de decorticaciones extensas así como la desaférentación tálamo-estriatal previenen la transición hacia el estado despolarizado (Wilson, 1993). En esta situación, el potencial de membrana permanece en el “down-state”, cercano al potencial de inversión del ión potasio (Wilson, 1993). Este estado es similar al potencial de reposo registrado en NEMs en rebanadas de cerebro, en donde la mayor parte de las fibras córtico-estriatales han sido seccionadas (Pacheco-Cano et al., 1996; Hernández-López et al., 1997).

Si bien la entrada de información cortical es indispensable para el desarrollo de la biestabilidad en la NEM, la probabilidad de hacer una transición favorable al estado despolarizado y su cinética, así como la permanencia en cada estado, son factores determinados por las propiedades intrínsecas de la célula y por los moduladores presentes en el NE que favorecen uno u otro estado (Nicola et al., 2000; Vergara et al., 2003). La activación de los receptores dopaminérgicos y las vías de señalización asociadas a cada uno de ellos son decisivos en la regulación de diferentes proteínas efectoras implicadas en la regulación de la excitabilidad de la NEM.

1.4.2 Modulación dopaminérgica de la respuesta postsináptica excitadora

Los receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiónico (AMPA) y kainato (estos dos últimos son comúnmente considerados como no-NMDA), median la respuesta postsináptica excitadora rápida del glutamato y aspartato en la NEM (Cherubini et al., 1988; Jiang y North, 1991).

A potenciales de membrana cercanos al de reposo de la NEM, los receptores NMDA permanecen bloqueados por magnesio. La respuesta glutamatérgica a este nivel es mediada principalmente por los receptores no-NMDA. Si la NEM es suficientemente despolarizada (> -50 mV), el bloqueo de los receptores NMDA es removido contribuyendo así con la excitación de la célula (Herrling, 1985; Cherubini et al., 1988; Cepeda y Levine, 1998).

Las dos familias de receptores dopaminérgicos modulan postsinápticamente de manera diferente, cada uno de los componentes de la respuesta glutamatérgica (Cepeda et al., 1993; Levine et al., 1996; Cepeda y Levine, 1998; Flores-Hernández et al., 2002). La activación de los receptores D1 potencia la respuesta NMDA aislada farmacológicamente e inducida por estimulación de las fibras aferentes córtico-estriatales, así como la inducida por la aplicación iontoforética de glutamato y NMDA. El efecto puede ser mediado por la activación de corrientes de Ca^{2+} , en especial de tipo L y/o por la fosforilación directa del receptor NMDA, ya que la facilitación es atenuada por bloqueadores de los canales de calcio tipo L, por la inhibición farmacológica de la PKA (Galarraga et al., 1997; Cepeda y Levine, 1998) y en ratones mutantes que carecen de DARP-32 (Flores-Hernández et al., 2002); por el contrario, la aplicación de forskolina y el ácido okadaico, al igual que la activación de los receptores D1, aumentan la respuesta NMDA (Galarraga et al., 1997; Cepeda y Levine, 1998). La aplicación de quinpirole disminuye en forma consistente la potenciación provocada por los receptores D1 (Flores-Hernández et al., 2002). Este último efecto es notorio, considerando que los receptores D2 por sí solos tienen poco o ningún efecto sobre la respuesta mediada por la activación de los receptores a NMDA (Cepeda et al., 1993; Levine et al., 1996; Cepeda y Levine, 1998; Flores-Hernández et al., 2002).

Por otro lado, la activación de los receptores D2 disminuye selectivamente los potenciales postsinápticos excitadores mediados por AMPA aislados farmacológicamente, así como las respuestas a pulsos de glutamato y AMPA aplicados por iontoforesis (Cepeda et al., 1993, Levine et al., 1996; Cepeda y Levine, 1998; Hernández-Echeagaray y Levine, 2002). En este caso, poco se sabe de los mecanismos que intervienen en esta interacción (Cepeda y Levine, 1998).

1.4.3 Regulación dopaminérgica del patrón de disparo a través de otras conductancias.

Como ya se mencionó, el rango de actividad de los receptores dopaminérgicos abarca, además de los receptores glutamatérgicos, diferentes canales iónicos de la NEM implicados en la regulación del patrón temporal de disparo. En este sentido, diferentes trabajos realizados en nuestro laboratorio han descrito el papel que juegan los receptores D1 en la regulación de la excitabilidad de la NEM. A continuación se resumen estos hallazgos, mismos que ofrecen un contexto para el presente trabajo de tesis.

Conductancias de potasio:

Como se mencionó previamente, la activación selectiva de los receptores D1 induce un aumento significativo en la rectificación anómala de la célula que media el estado hiperpolarizado en la biestabilidad de la NEM.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio en el que se utilizaron rampas de corriente despolarizante inyectadas intracelularmente para asemejar experimentalmente el curso temporal de la transición hacia el estado despolarizado de la NEMs, se demostró que la activación selectiva de los receptores D1 inhibió la generación de potenciales de acción durante el estado más despolarizado de la rampa (Pacheco-Cano et al., 1996). Este protocolo permite además estudiar la respuesta del voltaje de la célula ante la corriente inyectada en un amplio rango de potenciales de membrana subumbrales (aproximadamente de -90 mV a -45 mV). El análisis detallado de la relación corriente-voltaje, reveló que la activación de los receptores D1 indujo un aumento en la rectificación anómala de la célula

dando como resultado una disminución en su resistencia de entrada, alejando así el potencial de membrana del umbral de disparo.

En este mismo trabajo se demostró que la activación de los receptores D2 disminuyó la frecuencia de disparo de la célula, sin alterar la resistencia de entrada a nivel subumbral, lo que sugiere que la neuromodulación ejercida por dichos receptores se da a potenciales de membrana ya cercanos al umbral de disparo.

Mediante la realización de registros electrofisiológicos en la modalidad de "cell-attached" "patch-clamp" en NEMs, se ha descrito la presencia de canales iónicos de potasio con una conductancia de 85 pS cuya probabilidad de apertura depende absolutamente de la presencia de DA ó de agonistas selectivos de los receptores D2; la activación de estos canales es insensible al voltaje (Freedman y Weight 1988; Greif et al., 1995). Actualmente se desconocen los mecanismos de acción mediante los cuales los receptores D2 regulan la conductividad de estos canales, así como su implicación en el disparo de la NEM.

Conductancias de sodio:

Como se mencionó previamente, la activación de los receptores dopaminérgicos D1 disminuye las corrientes aisladas de sodio en NEMs disociadas (Surmeir y Kitai 1993b). Esta modulación es mediada por la fosforilación directa de los canales (atribuida a PKA) y se manifiesta como una disminución en la corriente máxima así como un desplazamiento de la curva de inactivación (h_{∞}) de dichas corrientes, hacia potenciales de membrana más hiperpolarizados (Surmeir y Kitai 1993b).

Por otro lado, Cepeda y colaboradores (1995) han descrito que la activación de los receptores D1 también reduce corrientes persistentes de sodio susceptibles de ser bloqueadas por tetratoxina y que podrían estar implicadas en la regulación de oscilaciones rítmicas, así como en el disparo repetitivo de la NEM.

En cuanto a la acción de los receptores D2 sobre las conductancias de sodio, Surmeier y Kitai (1993b) han reportado que en un grupo de NEMs (en el 55 % de las células estudiadas) la acción de los agonistas D2 disminuye la amplitud de las corrientes de sodio aisladas, mientras que en otro grupo (el 20 % de las células estudiadas) la activación de los receptores D2 incrementa su amplitud.

Conductancias de calcio:

La entrada de calcio al interior de la NEM juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo de la NEM (Galarraga et al., 1989).

El influjo de este catión divalente está mediado principalmente por canales dependientes de voltaje que se activan a potenciales despolarizados (> -60 mV): corrientes de tipo L, N, P/Q y R han sido disecadas en NEMs disociadas (Bargas et al., 1994; Cantrell et al., 1995; Mermelstein et al., 1999; Foehring et al., 2000). Cada una de estas corrientes entrantes catiónicas promueve diferentes aspectos en el disparo de la NEM: Las corrientes tipo L proveen a la célula con una despolarización lenta subumbral que facilita el disparo repetitivo de la célula (Hernández-López et al., 1997), mientras que el calcio de las corrientes N y P/Q activa preferentemente corrientes salientes de potasio tipo SK y BK que determinan el pospotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un potencial de acción (Vilchis et al., 2000).

Como ya se mencionó, la activación de receptores D1 induce un aumento en las corrientes de calcio tipo L (Surmeier et al., 1995a,b). Cuando el potencial de membrana se mantiene a niveles despolarizados (> -60 mV) en donde la influencia de la rectificación anómala es mínima, la activación de los receptores D1 promueve la generación de mesetas despolarizantes prolongadas (cientos de milisegundos), mediadas principalmente por estas conductancias de calcio. Estos eventos acercan el potencial de membrana hacia el umbral para la generación de potenciales de acción, facilitando e incrementando la frecuencia de disparo de la célula (Hernández-López et al., 1997). Ello ocurre pese a que los receptores D1 también incrementan de manera moderada la amplitud del PPH, efecto que es ocluido

por el agonista de los canales de calcio tipo L, el BAY-K 8644 (Hernández-López et al., 1996).

La modulación de los receptores D1 sobre las conductancias tipo L es también observada como un aumento en la duración de los potenciales de Ca^{2+} inducidos por el bloqueador de canales de potasio, cloruro de tetraetilamonio (TEA; Kita et al., 1985). Este efecto fue ocluido por el BAY-K 8644 (Hernández-López et al., 1997).

En el contexto de la biestabilidad de la NEM, la familia de receptores D1 juega un doble papel modulador. Durante el estado hiperpolarizado, la acción de estos receptores sobre la rectificación anómala de la NEM ejercerá un efecto inhibitorio en la neurona. Sólo un comando excitador suficientemente fuerte y sincronizado haría transitar el potencial de membrana hacia el estado despolarizado. Una vez ahí, los receptores D1 tienen un efecto excitador al promover las conductancias de calcio tipo L y potenciar la respuesta NMDA. Estas dos acciones conjuntas compensarían la influencia de la rectificación saliente, ayudando al potencial de membrana de la célula a alcanzar el umbral para la generación de potenciales de acción.

El conocimiento que se tiene sobre los mecanismos por los cuales los receptores D1 regulan la respuesta de disparo de la NEM, contrasta con la poca evidencia experimental disponible en la literatura, en donde se estudie de manera directa el papel modulador de los receptores D2 sobre el patrón temporal de disparo de la NEM. Este hecho adquiere una mayor relevancia si se considera que gran parte de la terapéutica de varios desórdenes psicomotores y endocrinos, se basa en la administración de agonistas o antagonistas selectivos para esta familia de receptores (Levant, 1997; Faraci et al., 1998; Strange 2001). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de tesis fue estudiar la acción moduladora de los receptores D2 sobre el patrón de disparo de la NEM.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Antecedentes:

El papel que juegan los receptores D2 en la regulación de las propiedades de disparo de las neuronas neostriatales de proyección, permanece como un enigma. La literatura concerniente a este respecto es limitada y controversial. Esto se debe a que la mayor parte de los estudios orientados a resolver este problema han utilizado métodos indirectos para estimar la actividad de la NEM (Nestler, 1994).

Comúnmente se asume que la activación de esta familia de receptores suprime la actividad de la NEM encefalinérgica. Este supuesto está fundamentado en dos tipos de evidencias:

- Lesiones de las vías nigro-estriadas, con una consecuente disminución en los niveles dopaminérgicos, inducen un aumento significativo en la expresión del neuropéptido encefalina (Gerfen et al., 1990).

- El bloqueo selectivo de estos receptores induce un aumento en la transcripción de genes de expresión temprana, así como de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (Chesselet et al., 1998).

Estos cambios son considerados como evidencia del papel inhibitorio de los receptores D2 sobre la actividad neuronal y la transcripción genética. Sin embargo, existen otros reportes difíciles de reconciliar con este modelo. Por ejemplo, la activación de los receptores D2 en rebanadas de cerebro, incrementa la actividad de la proteína fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina (Nishi et al., 1997) y de la proteína cinasa activada por mitógenos dependiente de calcio (Yan et al., 1999). La estimulación de los receptores D2 es también necesaria para la inducción de fenómenos plásticos en el NE (Calabresi et al., 1992). En conjunto, estos resultados sostienen que esta familia de receptores aumenta la actividad celular con un incremento correlacionado en los niveles de calcio intracelular.

Los trabajos electrofisiológicos en donde se han realizado registros intracelulares y extracelulares para estudiar la modulación del patrón de disparo de las NEMs por la activación de los receptores dopaminérgicos D2, no han arrojado resultados claros y reproducibles. La activación por DA de los receptores D2 ha sido descrita como excitadora, inhibidora e incluso inefectiva en modular la actividad eléctrica de las NEM (Herrling y Hull, 1980; Uchimura et al. 1986; Akaike et al., 1987; Hu y Wang, 1988; Hooper KC et al., 1997). Estos hechos han complicado aún más el entendimiento del papel fisiológico que juegan estos receptores en la excitabilidad de la neurona.

Por otro lado, un número creciente de evidencias experimentales demuestra la extensa colocalización de miembros de ambas familias de receptores dopaminérgicos en la NEM, lo que plantea la interrogante de cuál es la relevancia fisiológica de activar ambas familias de receptores en una misma NEM.

En el presente trabajo de tesis se presentan resultados electrofisiológicos que dan cuenta del papel fisiológico de los receptores D2, en la regulación de la excitabilidad de la NEM, así como de la interacción funcional existente entre ambas familias de receptores.

3. OBJETIVOS.

Los experimentos descritos en esta tesis doctoral estuvieron encaminados a estudiar de manera sistemática, la acción moduladora de los receptores D2 en el patrón temporal de disparo de la NEM:

- Se evaluó el efecto de activar farmacológicamente los receptores D2 en el potencial de acción de calcio inducido por TEA, con el objeto de determinar si esta familia de receptores modula alguna conductancia específica de este catión (Kita et al., 1985; Hernández-López et al., 1997).

- Se estudió el efecto modulador de los agonistas de la familia D2 en la generación de las mesetas despolarizantes, así como en el PPH que sigue a un potencial de acción. Estos dos eventos regulan directamente la excitabilidad de la NEM (Pineda et al 1992; Hernández-López et al., 1997).

- Se efectuaron además protocolos de estimulación intracelular, inyectando pulsos de corriente despolarizante de diferentes intensidades, con el objeto de estudiar el impacto fisiológico de activar la familia de receptores D2 en el disparo repetitivo de la NEM. Para ello se efectuaron análisis de las curvas función "Intensidad-Frecuencia" (I-F).

Como ya ha sido mencionado, un amplio porcentaje de NEMs coexpresa miembros de ambas familias de receptores dopaminérgicos. En este sentido, una vez que se caracterizó la respuesta moduladora de los receptores D2 sobre el disparo repetitivo de la NEM, se quiso estudiar la posible interacción funcional que existe entre los receptores D1 y D2 en una misma célula; y así determinar si alguna familia tiene algún efecto dominante sobre la otra.

4. MÉTODO.

Los resultados que se presentan en esta tesis fueron obtenidos mediante registros intracelulares de NEMs del NE, en la modalidad de fijación de corriente, en rebanadas de cerebro de ratas Wistar de 30 días de edad (100-120 gr.).

4.1 Obtención de las rebanadas de cerebro.

Cada rata fue anestesiada con éter antes de ser decapitada. El cerebro fue removido rápidamente del cráneo y sumergido en líquido cerebroespinal artificial (LCEA) helado ($\approx 5^{\circ} \text{C}$), constituido por (en mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 y 11 glucosa (pH=7.4, 300 mOsm/l con glucosa). En todo momento, esta solución estuvo constantemente burbujeada por una mezcla de 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 . Después de permanecer un minuto sumergido, a cada cerebro le fue removido el cerebelo y el bulbo olfatorio. Los hemisferios fueron separados mediante un corte a lo largo de la comisura interhemisférica y adheridos con cianocrilato a una caja de petri colocada en el vibratomo (PELCO 101), con el cual se obtuvieron rebanadas parasagittales de 350 μm de grosor.

Las rebanadas con NE fueron seleccionadas e inmediatamente después de cada corte, fueron sumergidas en un vaso de precipitados con LCEA a temperatura ambiente. Ahí se dejaron reposar por espacio de una hora antes de comenzar los registros.

Cada rebanada fue colocada y sumergida en una cámara de registro, en donde fueron perfundidas por gravedad y de manera constante a una tasa de 1 mililitro por minuto con el mismo LCEA a la temperatura corporal del roedor, 33-35 $^{\circ}$ C.

4.2 Registros electrofisiológicos:

Cada neurona fue empalada utilizando microelectrodos de vidrio (borosilicato, Frederick Haer & Co, Bowdoinham ME) previamente llenados con una solución de acetato

de potasio 3M y biocitina al 1 % (resistencia d.c. 80-120 M Ω). Los microelectrodos fueron elaborados con un estirador de micropipetas horizontal (Sutter Instruments CO. P-87).

La señal registrada fue amplificada con un sistema de amplificación de alta impedancia, acoplado a un puente Wheatstone con componentes activos (Neuro Data, Cygnus Technology, Inc, Delaware Water Gap, PA); digitalizada a 40 KHz y grabada en cintas de video tipo VHS. A lo largo de cada experimento, la señal electrofisiológica fue monitoreada en un osciloscopio (Nicolet 310, Madison WI.), teniendo especial cuidado en balancear el puente ante cualquier desajuste.

A través del electrodo de registro se inyectaron pulsos de corriente de diferente duración y amplitud generados por una unidad de aislamiento (Digitimer LTD. DS2A) y disparados por un estimulador (Grass Instruments S88, Quincy MA.). Con la inyección de corriente directa continua se mantuvo el potencial de membrana en los niveles requeridos.

4.3 Desarrollo de cada experimento.

Una vez obtenido el empale, se aseguró que la célula no presentara evidencia eléctrica de daño celular y que su patrón de disparo tuviera las características de una NEM sin signos notables de daño celular (Wilson, 1998). En estas condiciones el potencial de reposo registrado fue de -85 ± 5 mV.

Cada experimento constó básicamente de dos fases: Una de control, en la que cada protocolo de estimulación fue realizado en ausencia de cualquier agonista de las familias de receptores dopaminérgicos; y la fase experimental, realizada posteriormente en presencia de los diferentes agonistas añadidos en el medio de perfusión. Con este sistema se logró un recambio total del líquido en la cámara de registro, en un tiempo aproximado de 10 minutos, después de lo cual se realizaron los registros experimentales. Al término de cada experimento, la neurona fue inyectada con biocitina por 15 minutos para su posterior identificación anatómica (Horikawua y Armstrong, 1988). Brevemente, las rebanadas se fijaron en paraformaldehído al 4 % y ácido pícrico al 1 % en un amortiguador de fosfatos

(0.1 M, pH 7.4) durante 24 horas. Posteriormente fueron cortadas en el vibratomo obteniendo rebanadas más delgadas (60 μm). Estas últimas fueron incubadas con avidina-peroxidasa (Kit ABC-HRP de Vector) y tritón X-100 (0.2 %). Después los cortes fueron lavados con una solución salina amortiguada a temperatura ambiente. Finalmente la actividad de peroxidasa se reveló con 3,3-diaminobenzidina (0.05 %) y peróxido de hidrógeno (0.01 %) por un periodo de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.

Todos los experimentos reportados en esta tesis fueron realizados en NEMs (ver figura 5).

4.4 Fármacos.

Para la realización de los experimentos se emplearon los siguientes fármacos;

- Agonistas D2: Quinpirole y Quinelorane (5-10 μM ; RBI-Sigma St. Louis, MO).
- Agonista D1: SKF-81297 (1-5 μM ; RBI-Sigma St. Louis, MO).
- Agonista de canales de calcio tipo L: BAY-K 8644 (2.5-5 μM ; RBI-Sigma St. Louis, MO).
- Bloqueador de canales de calcio tipo L: Nicardipina (2.5 μM ; RBI-Sigma St. Louis, MO).
- Bloqueador de canales de calcio tipo N: ω -Conotoxina GVIA (1 μM ; Alomone Labs. Jerusalem-Israel).
- Bloqueador de canales de calcio tipo P/Q: ω -Agatoxina TK (400 nM; Alomone Labs. Jerusalem-Israel).
- Bloqueador de canales de potasio: TEA (20 mM; RBI-Sigma St. Louis, MO).

Cada uno de estos reactivos fue preparado al momento del experimento, a partir de soluciones madre previamente preparadas (no más de una hora antes de su utilización). Por su sensibilidad a la luz, la mayor parte de estos fármacos fueron pesados, diluidos y aplicados al experimento en el cuarto de registro iluminado con luz tenue.

Es importante mencionar que no se encontraron diferencias significativas en las acciones moduladoras ejercidas por ambos agonistas D2, en cada uno de los parámetros

electrofisiológicos medidos en este trabajo; por esta razón, en la presente tesis se han agrupado en uno mismo grupo los resultados obtenidos por cada agonista D2.

4.5 Procesamiento de datos.

La señal electrofisiológica fue transferida a una computadora PC mediante el uso de programas diseñados en nuestro laboratorio en un ambiente LabView (Nacional Instruments, Austin TX). Cada trazo registrado fue analizado y graficado mediante el programa Origin (v 6.0; Microcal TM, Northampton MA).

Los datos presentados en esta tesis pertenecen a escalas de "razón" (frecuencia, tiempo, voltaje, etc.); sin embargo, no contamos con evidencia *a priori* acerca del tipo de distribución que siguen. Además, por el tipo de metodología utilizada así como por el costo de varios de los experimentos, se contó con muestras pequeñas de neuronas. Por estas razones se efectuaron comparaciones estadísticas no paramétricas (Siegel y Castellan, 1998). Los resultados obtenidos son pareados, es decir, en cada neurona se comparó la respuesta previa y posterior a la manipulación experimental (por ejemplo, la adición de algún fármaco), por ello se utilizó la prueba de rangos asignados de Wilcoxon de dos colas (Siegel y Castellan, 1995; Systat v.7. SPSS Inc., Chicago IL).

5. RESULTADOS.

Los resultados que a continuación se presentan fueron obtenidos en NEMs identificadas electrofisiológica y anatómicamente (ver figura 5). Todas ellas fueron ubicadas en la región dorsal del estriado.

Con el objeto de facilitar la lectura de esta tesis, los resultados han sido divididos en tres apartados:

En el primer apartado se describe el papel modulador que juegan los receptores de la familia D2 en diferentes fenómenos determinantes del disparo de la NEM. Parte de mis resultados fueron publicados en un artículo (Hernández-López et al., 2000) en colaboración con el laboratorio del Dr. James Surmeier del Institute for Neurosciencie, en Northwestern University Medical School, Chicago. El artículo es anexado en este apartado y en él se describe la modulación de los receptores D2 sobre las corrientes aisladas de calcio tipo L en NEMs disociadas, así como las vías de señalización implicadas en ésta respuesta.

En el segundo apartado se anexa un artículo de mi autoría, en donde se examina con detalle la participación de diferentes conductancias de calcio en el disparo repetitivo de la NEM. Estos resultados son de gran importancia para validar los hallazgos obtenidos por la activación de cada una de las dos familias de receptores dopaminérgicos.

Por último, en el tercer apartado se presenta evidencia electrofisiológica que da cuenta de la interacción funcional existente entre ambas familias de receptores dopaminérgicos en una misma NEM.

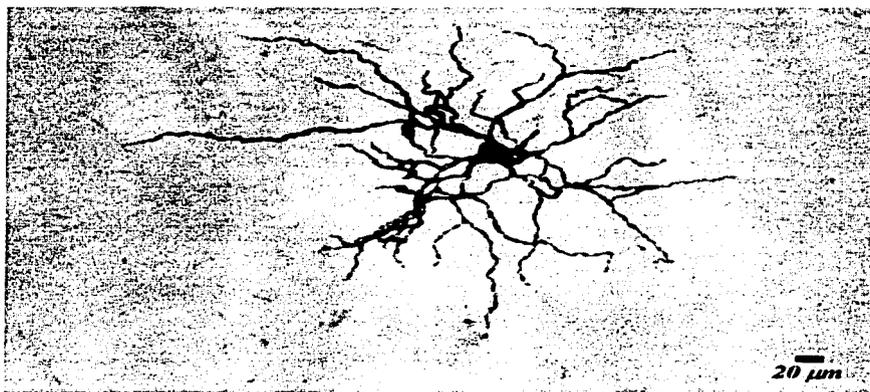
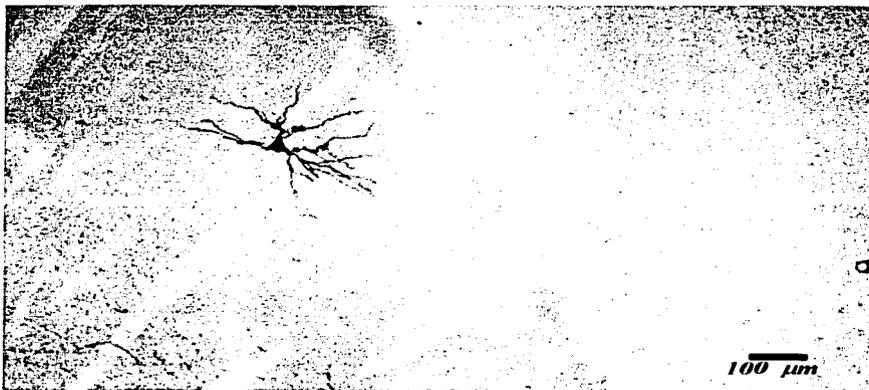


Figura 5. Ejemplos de dos neuronas espinosas medianas a diferente amplificación (ver escalas de tamaño), marcadas intracelularmente con biocitina y reveladas mediante el protocolo descrito en el método. Todas las neuronas registradas se localizaron en la porción dorsal del estriado. Nótese en la foto superior, el límite entre el cuerpo calloso (en blanco) y el estriado.

APARTADO 1.

La activación de los receptores dopaminérgicos tipo D2 reduce la excitabilidad de la neurona espinosa mediana.

La activación de los receptores D2 disminuye las conductancias de calcio tipo L.

Como se ha descrito en la introducción de esta tesis, los receptores D1 ejercen gran parte de su acción fisiológica en la NEM, modulando las diferentes conductancias de calcio de estas células (Hernández-López et al., 1997), que cumplen un papel importante en la regulación de la excitabilidad (Galarraga et al., 1989). Por otro lado, la acción de los receptores D2 podría tener lugar a potenciales de membrana cercanos al umbral de disparo de la célula (≈ -45 mV; Pacheco-Cano et al., 1996), justo en donde las diferentes conductancias de calcio de la NEM están activas (> -60 mV). Por esta razón, se evaluó el efecto de activar esta familia de receptores en el potencial de acción de calcio inducido por TEA (20 mM).

Como se observa en la figura 7B del artículo anexado en este apartado, así como en la figura 18 del tercer apartado de resultados de esta tesis, los agonistas quinpirole y quinolorane (5-10 μ M) redujeron en un 25 % la duración del potencial de acción de calcio ($n = 5/5$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). Este efecto fue ocluido por el antagonista de los canales de calcio tipo L, nicardipina (2.5 y 5 μ M; $n = 3$; ver figura 7 B del artículo), lo que sugiere que los receptores D2 actúan disminuyendo estas conductancias de calcio. Esta última posibilidad fue corroborada mediante el registro de las corrientes aisladas de calcio, provocadas por la inyección de comandos despolarizantes de voltaje en NEMs disociadas. La activación farmacológica de los receptores D2 disminuyó en un 29 % la corriente total de bario a través de los canales de calcio (ver figura 1 del artículo). Este efecto fue reproducido en el 65 % de las células estudiadas. En presencia nifedipina (5 μ M), un antagonista de los canales de calcio tipo L, el efecto modulador de los receptores D2 disminuyó significativamente siendo solamente de un 10 % (ver figura 2 A y B del artículo).

Por otro lado, el agonista de los canales de calcio tipo L, el BAY-K 8644 (2.5 - 5 μ M), aumentó significativamente la corriente total de calcio, así como el curso temporal de las corrientes de cola registradas durante la fase de repolarización del potencial de membrana de la célula (ver figura 2 C y D del artículo). Ambos eventos fueron revertidos

dependiente de calcio, calcineurina (PP2-B) que en su forma activa, podría desfosforilar a DARP-32 suspendiendo así su efecto inhibitor sobre la PP-1. Esta última estaría libre para desfosforilar el canal de Ca^{2+} tipo L, aunque también se plantea la posibilidad de que la calcineurina actúe directamente sobre el canal (Armstrong et al., 1991).

Modulación de las mesetas despolarizantes por activación de los receptores tipo D2.

Las corrientes de calcio tipo L en las NEMs determinan la generación de mesetas despolarizantes que pueden ser observadas cuando el potencial de membrana de la neurona se encuentra en valores subumbrales, relativamente despolarizados (> -55 mV). Estos eventos pueden ser estimulados por la inyección de un breve pulso de corriente (≈ 20 milisegundos) y pueden desarrollarse por varios cientos de milisegundos e inclusive provocar la generación de potenciales de acción aún después de que el pulso de corriente ha cesado (ver figura 16 A en el tercer apartado resultados; Hernández-López et al., 1997).

La activación de los receptores D2 disminuyó significativamente ($p < 0.05$, prueba de Wilcoxon) la probabilidad de aparición, la duración y la amplitud de las mesetas despolarizantes registradas en ausencia de algún fármaco ($n = 7/12$; ver figura 16 B del tercer apartado de resultados), así como aquellas exacerbadas por el agonista BAY-K 8644 ($n = 6/6$; ver figura 7 A del artículo).

Modulación del PPH por activación de los receptores tipo D2.

El PPH que sigue a un potencial de acción y que depende de conductancias de potasio dependientes de calcio, canales tipo BK y SK, juega un papel importante en la regulación de la frecuencia de disparo de las NEMs (Pineda et al., 1992). Las conductancias de calcio implicadas en la regulación de estos eventos son las N y P/Q (Vilchis et al., 2000). Diferentes neuromoduladores ejercen su acción a este nivel (Pineda et al., 1995), por lo que en este trabajo se evaluó también la acción de los agonistas de los receptores D2 en el PPH (figura 7).

En la figura 7 se muestran los potenciales de acción de dos células, seguidos por sus respectivos PPHs (ver ampliación de los PPHs en la parte inferior de la columna A y B).

Cada potencial fue provocado por la inyección intracelular de un pulso de corriente despolarizante de duración breve (≈ 20 milisegundos), mientras el potencial de membrana era mantenido con corriente DC continua a niveles despolarizados subumbrales (> -60 mV). La activación de los receptores D2 por los agonistas quinpirole ó quinlorane ($5-10 \mu\text{M}$), redujo la amplitud del PPH en un $28 \pm 2 \%$ (ver la figura 7 A y la figura 19 incluida en el tercer apartado de resultados; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). Este efecto se observó en 7 de 12 células estudiadas. En el recuadro de la columna A se muestra la variación en la amplitud del PPH (en valores absolutos de voltaje), en cada una de las células que tuvieron respuesta positiva a los agonistas. En la columna B se ejemplifica un caso en donde el quinpirole no modificó la amplitud del PPH. La ausencia de efecto a los agonistas D2 fue observada en cinco células ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon).

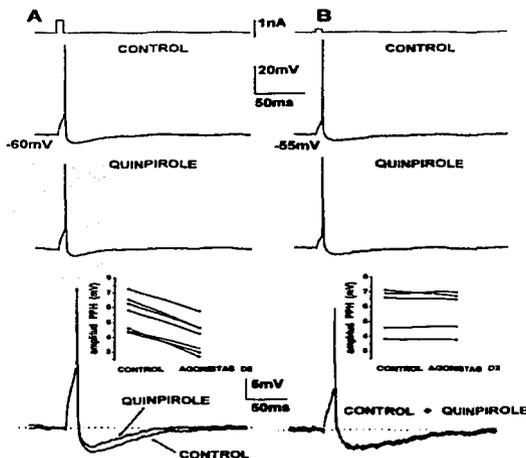


Figura 7. El quinpirole reduce la amplitud del PPH. Se muestran los potenciales de acción de dos células seguidos por sus respectivos PPHs (ver ampliación del PPH en la parte inferior de A y B). A, el quinpirole ($5-10 \mu\text{M}$), redujo la amplitud del PPH en un $28 \pm 2 \%$. Este efecto se observó en el 58 % de las células estudiadas ($n = 7/12$), ver en el recuadro la disminución en la amplitud del PPH (expresada en valores absolutos de voltaje) en cada uno de los casos positivos. B, se muestra un caso en donde el agonista no tuvo respuesta.

Modulación de la frecuencia de disparo por activación de los receptores tipo D2.

Al reducirse la amplitud del PPH, el potencial de membrana de la célula estaría más próximo a alcanzar nuevamente el umbral de generación del potencial de acción, lo que

favorecería el disparo repetitivo de la NEM. En este sentido, la acción de los receptores D2 sería incrementar la frecuencia de disparo de la célula; sin embargo, la inhibición en la generación de las mesetas despolarizantes mediada por estos receptores tendría el efecto opuesto.

Como se muestra en la figura 7 C y D del artículo anexado en este apartado, la activación de los receptores D2 por el agonista quinpirole redujo la excitabilidad de las NEMs. Este efecto se observó también con el agonista quinlorane (5-10 μM ; ver figura 17 en el tercer apartado de resultados). En total, la respuesta en el disparo a los agonistas D2 se reprodujo en el 82 % de las células estudiadas ($n = 14/17$). Dichos fármacos redujeron en un $39 \pm 6\%$ ($p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; $n = 14/17$) el valor de la frecuencia media de la curva I-F (ver las figuras 7 C y D del artículo y las 17 A y B en el tercer apartado de resultados). En el 18 % restante de las células, los agonistas D2 no ejercieron ningún tipo de respuesta (figura 8).

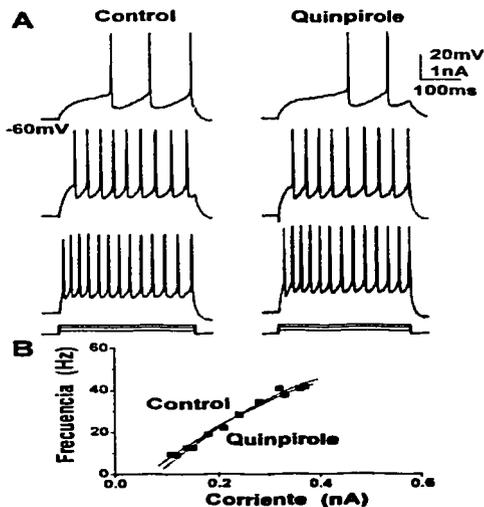


Figura 8. Ejemplo de una NEM sin respuesta al agonista D2. A, se muestran, tres trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de tres pulsos de corriente de diferente intensidad, en situación control (columna izquierda) y en presencia de quinpirole (5-10 μM ; columna derecha). B) curva relación intensidad-frecuencia (I-F), obtenida graficando el promedio del inverso de los últimos cuatro periodos inter-espigas de cada tren, versus la intensidad de la corriente inyectada para provocarlo. Notar cómo la curva I-F en este caso, no sufre ningún desplazamiento.

En las NEMs con respuesta positiva a los agonistas, los efectos sobre el PPH y la frecuencia de disparo fueron simultáneos. Este hecho se estudió con detalle en tres células (figura 9).

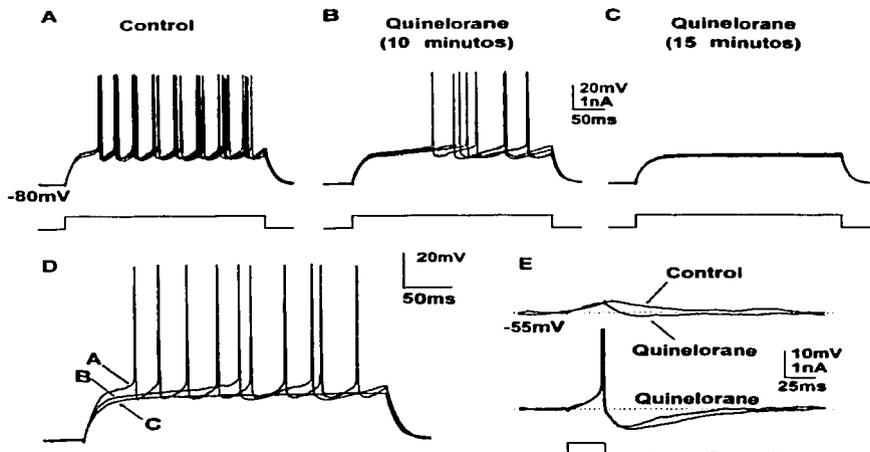


Figura 9. Los agonistas D2 disminuyeron la frecuencia de disparo de la NEM, pese a que el PPH fue también disminuido. Superposición de cuatro trazos de la respuesta en voltaje a un pulso rectangular de corriente inyectado intracelularmente (320 ms), en condición control (A), a los 10 minutos de añadido el quinlorane (B) y después de 15 minutos en presencia del agonista (C). D, se muestran tres trenes superpuestos representativos de A, B y C. Notar cómo el potencial de membrana en el estado estacionario de la respuesta al pulso, se aleja gradualmente del umbral de disparo. E, registros obtenidos de esta misma célula pero con el potencial de membrana mantenido a un nivel más despolarizado (-55 mV). La intensidad y duración del pulso de corriente fue ajustado para obtener un solo potencial de acción, así como mesetas despolarizantes que sobrepasarán la duración del estímulo. Nótese cómo en cada caso el agonista D2 disminuyó sustancialmente ambos eventos

En la figura 9 se compara la respuesta de una NEM a un pulso de corriente rectangular de aproximadamente 320 milisegundos de duración, en situación control y en presencia de quinlorane. En condiciones control el pulso de corriente inyectado provocó de manera constante la generación de trenes de ocho potenciales de acción (figura 9 A) sin embargo, en presencia de quinlorane la respuesta regenerativa de la célula ante la misma

cantidad de corriente fue abolida por completo. Este efecto fue gradual, pasando de una disminución en la frecuencia y sincronía del disparo (efecto observado a los 10 minutos de añadido el agonista; figura 9 B), a un cese total de cualquier evento regenerativo (15 minutos después de añadido el agonista; figura 9 C). El efecto inhibitorio se explica por un alejamiento del potencial de membrana del umbral de disparo durante la respuesta al pulso de corriente, tal y como se observa al sobreponer un trazo representativo de cada momento (figura 9 D). En esta misma célula, el agonista quinelorane también disminuyó la amplitud de las mesetas despolarizantes, así como el PPH (figura 9 E).

En conjunto, estos resultados demuestran que el efecto principal de la activación de los receptores D2 es inhibir la frecuencia de disparo a través de una disminución en la amplitud y duración de las mesetas despolarizantes activadas a potenciales subumbrales. La reducción observada en el PPH no es el efecto más importante del quinpirole, pues su disminución no produce un aumento en la frecuencia de disparo.

Conclusiones.

En cada uno de los protocolos estudiados, la activación de los receptores D2 provocó respuestas opuestas a las previamente descritas para los receptores D1 (Surmeier et al., 1995a y b; Hernández-López et al., 1997). Contrariamente a lo descrito para los receptores D1, los receptores D2:

1° Disminuyeron las conductancias de calcio tipo L. Este efecto fue evaluado mediante los potenciales de calcio generados por TEA, así como por las corrientes aisladas de calcio registradas en NEMs disociadas;

2° Disminuyeron la generación de mesetas despolarizantes sostenidas, registradas a potenciales de membrana justo por debajo del umbral de disparo;

3° Disminuyeron la frecuencia del disparo repetitivo de la NEM, pese a que la activación de estos receptores también reduce la amplitud del PPH que sigue a un potencial de acción.

La reducción en las conductancias de calcio tipo L fue mediada por la activación de la proteína fosfatasa calcineurina por el calcio liberado de pozas intracelulares, a través de la cascada de señalización: fosfolipasa C β 1-IP3.

El hecho de que los receptores D2 disminuyan las corrientes aisladas de calcio tipo L en NEMs disociadas, indican que los resultados presentados se deben a eventos post-sinápticos.

D₂ Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type Ca²⁺ Currents and Excitability via a Novel PLCβ1–IP₃–Calcineurin–Signaling Cascade

Salvador Hernández-López,¹ Tatiana Tkatch,¹ Enrique Perez-Garci,² Elvira Galarraga,² José Bargas,² Heidi Hamm,³ and D. James Surmeier^{1,3}

¹Department of Physiology and ²Institute for Neuroscience, Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois 60611, and ³Instituto de Fisiología Celular, UNAM Apartado Postal 70-253, Mexico DF 4510

In spite of the recognition that striatal D₂ receptors are critical determinants in a variety of psychomotor disorders, the cellular mechanisms by which these receptors shape neuronal activity have remained a mystery. The studies presented here reveal that D₂ receptor stimulation in enkephalin-expressing medium spiny neurons suppresses transmembrane Ca²⁺ currents through L-type Ca²⁺ channels, resulting in diminished excitability. This modulation is mediated by Ca_vβ₁ activation of phospholipase C, mobilization of intracellular Ca²⁺ stores, and activation of the

calcium-dependent phosphatase calcineurin. In addition to providing a unifying mechanism to explain the apparently divergent effects of D₂ receptors in striatal medium spiny neurons, this novel signaling linkage provides a foundation for understanding how this pivotal receptor shapes striatal excitability and gene expression.

Key words: neostriatum; patch clamp; dopamine; neuromodulation; medium spiny neuron; basal ganglia; electrophysiology; single-cell RT-PCR; ion channel; calcium

Disruptions in striatal dopaminergic signaling are thought to underlie a variety of psychomotor disorders including drug abuse, schizophrenia, Tourette's syndrome, and Parkinson's disease (Hornykiewicz, 1973; Meltzer and Stahl, 1976; Sandor, 1993; Nessler and Aghajanian, 1997). In spite of the recognition that alterations in dopaminergic signaling are the basis of these psychomotor disorders, the cellular mechanisms by which dopamine affects striatal function have remained something of a mystery. This is particularly true of D₂ receptors. These receptors are expressed at high levels by several groups of neurons in the striatum, including GABAergic medium spiny neurons that project to the globus pallidus and express enkephalin (Gerfen, 1992; Surmeier et al., 1996).

The prevailing model of the striatum (Gerfen, 1992) suggests that D₂ receptor stimulation suppresses the activity of enkephalin-expressing striatal medium spiny neurons. This inference is based primarily on two indirect observations. First, dopamine-depleting lesions increase striatal expression of enkephalin, a peptide released by medium spiny neurons expressing D₂ receptors (Gerfen, 1992). Second, neuroleptic blockade of D₂ receptors increases striatal expression of immediate early genes and glutamic acid decarboxylase (Chesselet et al., 1998). These changes are taken as evidence of D₂ receptor-mediated suppression of neural activity and gene transcription. However, there are a number of observations that are difficult to reconcile with this model. For example, D₂ receptor stimulation in striatal slices increases the activity of a Ca²⁺-dependent protein phosphatase (calcineurin) and of Ca²⁺-dependent mitogen-activated protein (MAP) kinase (Nishi et al., 1997; Yan et al., 1999). D₂ receptor stimulation also is necessary for the induction of synaptic plasticity in the striatum (Calabresi et al., 1992). These studies argue that D₂ receptor stimulation increases,

rather than decreases, activity and intracellular Ca²⁺ levels in striatal medium spiny neurons.

Direct measurements of neuronal activity have not provided a means of explaining these seemingly contradictory findings. Because the transcriptional and biochemical events at the heart of the signaling discrepancy are Ca²⁺ dependent, a key question is whether D₂ receptors can directly influence intracellular Ca²⁺ levels. An obvious way this might happen is via the modulation of transmembrane ion channels capable of carrying Ca²⁺ ions into the cytoplasm. One potential target of this type of modulation is the L-type Ca²⁺ channel, a channel that has a privileged association with transcriptional regulators in many neurons (Bading et al., 1993; Graef et al., 1999). Although they can be enhanced by several mechanisms (Viard et al., 1999), in medium spiny neurons L-type Ca²⁺ currents are increased by D₂ receptor stimulation of adenylyl cyclase and protein kinase A (Surmeier et al., 1995). Because the best-described effect of striatal D₂ receptors is inhibition of adenylyl cyclase (Sibley, 1995), D₂ receptor activation should, in principle, reduce L-type currents.

The studies described here were intended to test this hypothesis. They show that indeed D₂ receptor stimulation suppresses L-type Ca²⁺ currents in enkephalin-expressing medium spiny neurons. But, the suppression is not mediated by inhibition of adenylyl cyclase. Rather, D₂ receptor stimulation mobilizes intracellular Ca²⁺ stores via G_{βγ} activation of a phospholipase Cβ1 pathway, leading to a calcineurin-dependent reduction in L-type currents. This novel signaling linkage establishes a mechanism by which D₂ receptors can suppress spike activity and Ca²⁺-dependent gene transcription but activate Ca²⁺-dependent intracellular enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Electrophysiology. Whole-cell recordings from acutely isolated rat striatal neurons were obtained using previously published techniques (Surmeier et al., 1995; Mermelstein et al., 1999). The pipette solution consisted of (in mM): 180 N-methyl-D-glucamine (NMG), 40 HEPES, 0.5 MgCl₂, 0.5 BaF₃TA, 12 phosphocreatine, 2 Na₂ATP, 0.2 Na₂GTP, and 0.1 leupeptin, pH 7.2–7.3 with H₂SO₄, 265–270 mOsm/l. The external solution consisted of (in mM): 135 NaCl, 20 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.001 TTX, 5 BaCl₂, and 10 glucose, pH 7.4 with NaOH, 300–305 mOsm/l. All reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO) except ATP and GTP (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and BAPTA, calcineurin autoinhibitory peptide, and leupeptin (Calbiochem, La Jolla, CA). All drugs were prepared according to the manufacturer's specifications and applied with a

Received July 25, 2000; revised Sept. 15, 2000; accepted Sept. 21, 2000.

This work was supported by National Institutes of Health Grants NS 34696, DA 12958, and TW 01214 to D.J.S. and EY 10291 to H.H. Additional support was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 25812N to J.B. and E.G. We thank Sasha Ulrich for assistance with the RT-PCR experiments.

Correspondence should be addressed to Dr. D. James Surmeier, Department of Physiology, Northwestern University Institute for Neuroscience, Northwestern University Medical School, 320 East Superior Street, Chicago, IL 60611. E-mail: j-surmeier@northwestern.edu.

Copyright © 2000 Society for Neuroscience 0270-6474/00/208987-09\$15.00/0

45-1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

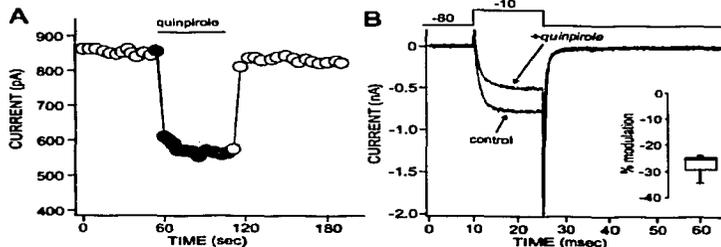


Figure 1. D₂-class receptor agonists decrease whole-cell Ba²⁺ current through Ca²⁺ channels in acutely isolated striatal neurons. **A**, Plot of peak Ba²⁺ currents evoked by a step to -10 mV from a holding potential of -80 mV. Quinpirole ($10 \mu\text{M}$) reversibly decreased peak currents. **B**, Representative currents used to construct **A**. Voltage protocol is shown at the top. Inset, A box plot summary of the percent reduction in peak current produced by quinpirole ($n = 5$). The central line of the box is the median of the distribution. The edges of the box are the interquartiles. The lines running from the edge of the box show the extremes of the distribution, excluding outliers.

“sewer pipe” capillary array (Surmeier et al., 1995; Mermelstein et al., 1999). C terminus of β adrenergic receptor kinase 1 (BARK-C) peptide (BARK-Cp) is comprised of residues 548–671 of the rat homolog of BARK. BARK-Cp (4.9 mg/ml) was dialyzed against the recording internal solution. This solution was diluted in the recording internal solution for a final concentration of 1 mg/ml .

Intracellular recordings were performed on rat dorsal neostriatal slices maintained *in vitro* as reported previously (Hernández-López et al., 1997). Recording was done in a submerged-type chamber superfused with saline of the same composition ($34\text{--}36^\circ\text{C}$). Sharp microelectrodes filled with 3 M potassium acetate and 1% biocytin were used. Rectangular current pulses of varying strengths ($100\text{--}200 \text{ pA}$) evoked spike activity. Records were obtained with an active bridge electrometer (Neuro Data, Cygnus Technology, Inc., Delaware Water Gap, PA), digitized, and saved on video tapes (40 kHz) for off-line analysis with a personal computer. Neurons were injected with biocytin as described previously. All neurons were medium spiny projection neurons. Experiments were paired, so that records in the presence and absence of bath-applied drugs were compared in the same neuron.

Fluorometry. For combined patch clamp and fluorometry, neurons were loaded with fura-2 pentapotassium salt ($100 \mu\text{M}$; Molecular Probes, Eugene, OR) through the patch pipette in a chelator-free recording internal solution (see above). Concomitant fluorometry and patch-clamp recording used Ba²⁺ as the charge carrier to eliminate transmembrane flux as a contributor to the fluorometric signal. For fluorometry without patch recording, neurons were incubated in buffer containing fura-2 AM ($5 \mu\text{M}$; Molecular Probes) for 25 min at 37°C in the dark. After loading, neurons were rinsed with buffer and equilibrated for 20 min at room temperature. Changes in cytoplasmic Ca²⁺ concentration were determined by measuring the fluorescence ratio (510 nm) after excitation with 340 and 380 nm wavelength light. Emission ratios were corrected for background fluorescence. Measurements were obtained with a Nikon Diaphot microscope C with a DeltaScan fluorometry system (Photon Technology International) running proprietary software.

Single-cell reverse transcription-PCR protocol. Protocols similar to those described previously (Baranuskas et al., 1999; Mermelstein et al., 1999). The PCR primers were developed from GenBank sequences using OLIGO software (National Biosciences). The primers used for enkephalin and substance P cDNA amplification have been published previously (Surmeier et al., 1996). The primers for phospholipase C $\beta 1$ (PLC $\beta 1$) cDNA (GenBank accession number M20636) were 5'-AAA GGC AAG GTT AGT GAG GAC AG-3' and 5'-TTC AGG CTA AGG GAT GTT TCT C-3'. The predicted product length was 253 bp . The primers for PKC δ cDNA (GenBank accession number AJ011033) were 5'-ATC CAA GCC ATG ACC AAA GTC-3' and 5'-GTC TCC CAT TTC TGC CTT ATG TG-3'. The predicted product length was 547 bp . The primers for PLC $\beta 3$ cDNA (GenBank accession number M99567) were 5'-AGC GCA GTC CAG A-3' and 5'-CTC TCG CCG CAG TTC AAA G-3'. The predicted product length was 420 bp . The primers for PLC $\beta 4$ cDNA (GenBank accession number L15556) were 5'-GGC AAT GAA GCA GTC GAA AGA-3' and 5'-GGC GTG ATC CTC TCC TCT C-3'. The predicted product length was 209 and 246 bp .

Statistical procedures. Data analysis was performed with SYSTAT (version 5.2; SPSS, Inc., Chicago, IL). Sample statistics are given as means \pm SEs. Box plots were used for graphic presentation of the data because of the small sample sizes.

RESULTS

D₂ receptor activation reduces Ca²⁺ channels

Whole-cell Ba²⁺ currents through Ca²⁺ channels were reversibly inhibited by the D₂-class receptor agonists (–) quinpirole (Fig. 1) and R(–)-propylnorapomorphine (NPA) in $\sim 65\%$ of the acutely

isolated medium-sized striatal neurons tested. At saturating agonist concentrations ($10 \mu\text{M}$), the mean reduction in peak current evoked by a voltage step to -10 mV was $28 \pm 2\%$ ($n = 5$) for quinpirole and $26 \pm 3\%$ for NPA ($n = 4$). Lower agonist concentrations produced smaller, qualitatively similar modulations ($0.50\text{--}5 \mu\text{M}$; $n = 6$). Previous studies have shown that D₂ receptors, like other G_{i/o}-coupled receptors, inhibit N- and P/Q-type Ca²⁺ channels but typically do not modulate L-type Ca²⁺ channels (Yan et al., 1997). However, in medium spiny neurons, the L-type channel antagonist nifedipine significantly reduced the modulation produced by quinpirole, suggesting that L-type channels were a major target of the D₂ receptor pathway (Fig. 2A,B). The mean modulation in the absence of nifedipine was 29% ($n = 8$), whereas it was only 10% ($n = 6$) in the presence of nifedipine ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis).

Another way of testing the involvement of L-type Ca²⁺ channels is via use of the dihydropyridine agonists such as (–)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)-phenyl]-3-pyridine carboxylic acid methyl ester (BAYK 8644 and 2,5-dimethyl-4-[2-(phenylmethyl)benzoyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid methyl ester (FPL) 64176 (Rampe et al., 1993). These agonists slow the deactivation of L-type Ca²⁺ channels during repolarization of the membrane; this selective slowing provides a convenient way of isolating currents through L-type channels. NPA reversibly reduced the slowly deactivating tail current attributable to L-type Ca²⁺ channels (see Fig. 2C,D). As shown in Figure 2C, inset box plot, the median reduction in the amplitude of the slow tail current by NPA ($10 \mu\text{M}$) was just $>20\%$ in responsive neurons ($n = 13$).

To verify the involvement of D₂-class receptors in the response, the ability of (–) sulpiride to antagonize the response was examined. Sulpiride ($5 \mu\text{M}$) (Weiss et al., 1985) had no effect of its own on the BAYK-enhanced L-type currents but blocked the effect of NPA ($10 \mu\text{M}$) on both step and tail currents; the effect of NPA reemerged when sulpiride was washed off the cell (Fig. 3A,B). In six neurons, the median NPA-induced modulation of the slow tail current was 22% in the absence of sulpiride and 2% in its presence (see Fig. 3A, inset; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis). The modulation of the current evoked during the depolarizing step also was antagonized by sulpiride ($n = 6$; median modulation = 4% ; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis).

There are three D₂-class receptors (D₂, D₃, or D₄) with a high affinity for NPA, quinpirole, and sulpiride. Although the D₂ receptor is the predominant striatal isoform, previous studies have identified a substantial subset of medium spiny neurons that express D₃ receptors (Surmeier et al., 1996). To determine which of these D₂-class receptors was responsible for the modulation, whole-cell recordings were followed by a single-cell reverse transcription (scRT)-PCR analysis. Because the dopamine receptor mRNAs appear to be of relatively low abundance and difficult to detect after whole-cell recording, the scRT-PCR experiments focused on two high-abundance peptide mRNAs that are strongly correlated with

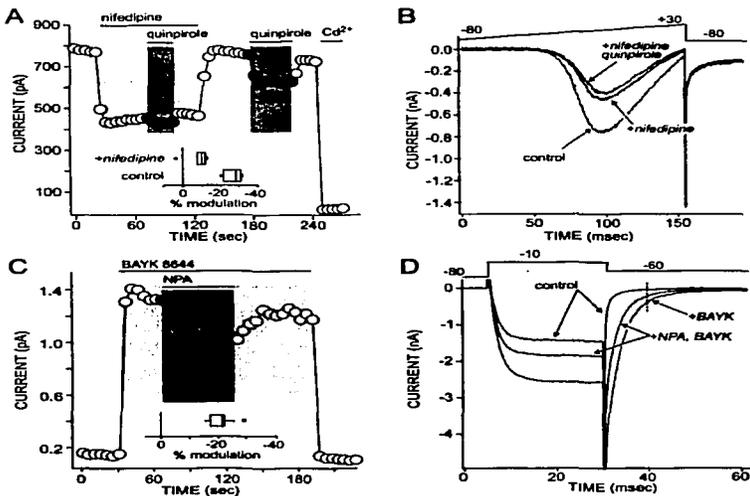


Figure 2. D₂-class receptor agonists decrease currents through L-type Ca²⁺ channels. *A*, Plot of peak Ba²⁺ current evoked by a voltage ramp (5 μM). Nifedipine (5 μM) reduced evoked currents and occluded the effects of quinpirole (10 μM); washing nifedipine off restored the quinpirole modulation. *Inset*, A box plot summary of the modulation in the presence and absence (control) of nifedipine (*n* = 6). The asterisk is an outlier, defined as a point that is either greater than three halves the interquartile range above the upper interquartile or less than three halves the interquartile range below the lower interquartile (Tukey, 1977). *B*, Representative currents used to construct *A*. Voltage protocol is shown at the top. *C*, Plot of tail current amplitude evoked by the protocol shown in *D* and measured at the dashed vertical line in *D*. BAYK 8644 increased tail amplitudes; NPA reversibly reduced the amplitude. *Inset*, A box plot summary of the percent reduction in tail current amplitude produced by NPA (*n* = 13). The filled circle is an outlier. *D*, Representative current traces used to construct *C*.

receptor expression. D₂ receptor expression is limited to medium spiny neurons expressing the releasable peptide enkephalin (Gerfen, 1992; Surmeier et al., 1996). On the other hand, D₃ receptor expression is limited to a subpopulation of medium spiny neurons expressing substance P in the dorsal striatum (Surmeier et al., 1996). In neurons expressing enkephalin, the modulation of L-type Ca²⁺ channels was robust (Fig. 3C; *n* = 6; median modulation = 19%), whereas neurons that only expressed substance P failed to exhibit a significant response (Fig. 3D; *n* = 3; median modulation = 0%), clearly implicating D₂ receptors in the modulation.

The D₂ receptor modulation is not dependent on inhibition of adenylyl cyclase

The activation of D₂ receptors inhibits adenylyl cyclase activity, reducing cytosolic cAMP levels and protein kinase A (PKA) activity (Sibley, 1995). PKA can enhance L-type Ca²⁺ channel currents in medium spiny neurons (Surmeier et al., 1995). To test directly whether D₂ receptors reduced L-type currents by inhibiting adenylyl cyclase, three experiments were performed. First, adenylyl cyclase was stimulated by incubating neurons in forskolin (1 μM) before NPA exposure. If inhibition of adenylyl cyclase were a key element in the signaling mechanism, forskolin stimulation should increase the absolute magnitude of the NPA modulation (Battaglia et al., 1985). It did not. Although forskolin significantly enhanced tail currents in the absence of BAYK 8644 (control median = 45 pA; *n* = 13; forskolin median = 74 pA; *n* = 6; *p* < 0.05, Kruskal–Wallis), the absolute modulation of BAYK 8644-enhanced tail currents was indistinguishable from that seen in control neurons (Fig. 4A; *n* = 5; median reduction = 20%; *p* > 0.05, Kruskal–Wallis). The D₂ receptor modulation of currents evoked by the test step were unaltered as well (*n* = 5; median reduction = 20%; *p* > 0.05, Kruskal–Wallis). A cyclase-dependent mechanism also predicts that blocking the degradation of cAMP should attenuate the D₂ modulation. But, the phosphodiesterase inhibitor IBMX (5 μM) did not affect the D₂ modulation of slow tail currents (*n* = 6; median modulation = 19%; *p* > 0.05, Kruskal–

Wallis) or step currents (*n* = 6; median modulation = 19%; *p* > 0.05, Kruskal–Wallis). Lastly, blocking the access of cAMP to PKA should blunt the D₂ modulation. However, as shown in Figure 4B, dialysis with a competitive inhibitor of cAMP, the Rp isomer of cyclic adenosine monophosphate (Rp–cAMPS; 10 μM), did not affect the ability of D₂ receptors to modulate tail current (*n* = 4; median modulation = 22%; *p* > 0.05, Kruskal–Wallis) or step currents (*n* = 4; median modulation = 20%; *p* > 0.05, Kruskal–Wallis). These observations, taken together with the fact that D₂ receptor activation effectively modulated currents in the absence of receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase, clearly suggest that D₂ receptors were working by another mechanism.

D₂ receptors mobilize intracellular Ca²⁺ via a phospholipase C pathway

If D₂ receptors were not acting via adenylyl cyclase and PKA, then how were they working? A number of studies have shown that L-type Ca²⁺ currents can be suppressed by elevations of the intracellular Ca²⁺ concentration (Chad and Eckert, 1986; Armstrong et al., 1991; Lukyanetz et al., 1998). In cells dialyzed with high concentrations of the fast Ca²⁺ chelator BAPTA (20 mM), a concentration sufficient to “clamp” the free Ca²⁺ concentration at a low nanomolar level, quinpirole had little or no effect on the BAYK-enhanced tail currents (Fig. 5A). Although quinpirole failed to modulate the slow tails in these neurons, it continued to reduce the peak current (although to a lesser extent), suggesting that the modulation of non-L-type channels was intact (*n* = 5; median modulation = 11%). Because BAPTA can have effects unrelated to Ca²⁺ buffering (Bernheim et al., 1991), cytosolic [Ca²⁺] was measured directly with fluorometric techniques in voltage-clamped neurons dialyzed with fura-2 (100 μM). These experiments revealed that in neurons in which the slow BAYK tail currents were modulated, NPA also induced a rapid and reversible elevation in cytosolic Ca²⁺. This elevation occurred in the absence of external Ca²⁺ and with the cell's membrane held at -80 mV (*n* = 4) (Fig. 5B), implicating release from intracellular stores.

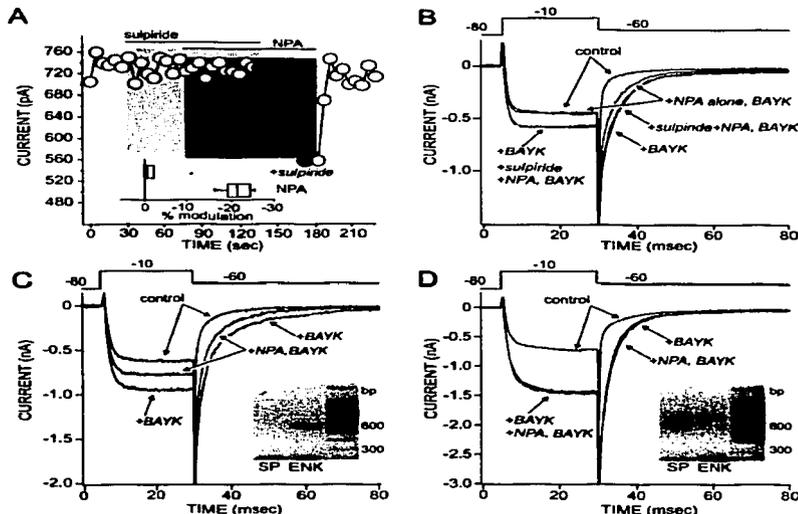


Figure 3. The modulation is dependent on D_2 receptors. *A*, A plot of Ba^{2+} current tail amplitudes as a function of time (see Fig. 2D). Sulpiride ($5 \mu M$) blocked the effects of NPA ($10 \mu M$); washing sulpiride off restored the NPA modulation. *Inset*, A box plot summary of the modulation in the presence and absence (NPA) of sulpiride ($n = 6$) is shown. The filled circle is an outlier. *B*, Representative currents used to construct *A* are presented. Voltage protocol is shown at the top. *C*, NPA modulated Ba^{2+} currents only in neurons shown by scRT-PCR to express enkephalin ($n = 6$). *Inset*, The gel shows the presence of enkephalin (*ENK*) and absence of substance P (*SP*) amplicons in this cell. *D*, Neurons expressing substance P, but not enkephalin, did not respond to NPA ($n = 3$). *Inset*, The gel shows the *SP* amplicon derived from this neuron.

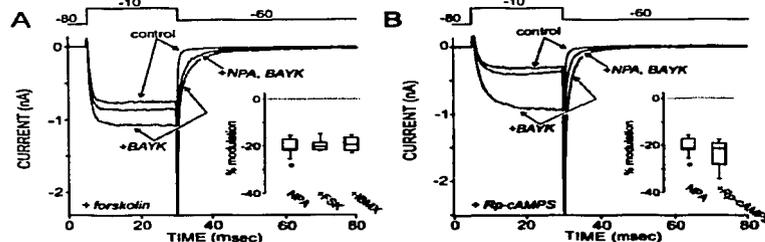


Figure 4. The D_2 receptor modulation is independent of alterations in adenylyl cyclase activity. *A*, Preincubation of cells in forskolin ($1 \mu M$) failed to alter the NPA ($5 \mu M$) modulation of BAYK 8644-enhanced tail currents or the modulation of currents evoked by the test step to -10 mV. Voltage protocol is shown at the top. *Inset*, Box plots of the tail modulation in control (NPA; $n = 10$), forskolin (FSK; $n = 5$), and IBMX ($n = 6$) solutions are shown. The asterisk is an outlier. These data were not significantly different. *B*, Cellular dialysis with the cAMP antagonist Rp-CAMPS also failed to alter the NPA modulation of BAYK 8644-enhanced tail currents. *Inset*, A box plot summary of the tail modulation in control ($n = 10$) and Rp-CAMPS ($n = 4$) dialyzed neurons is shown. These data were not significantly different.

NPA failed to alter intracellular Ca^{2+} levels in those neurons in which the slow BAYK tail currents were unmodulated ($n = 3$). To test this linkage further, medium spiny neurons were loaded with fura-2 AM and D_2 agonists applied in the presence and absence of extracellular Ca^{2+} . Fluorometric measurements were taken in these neurons without concomitant patch-clamp recording. NPA evoked a calcium transient in 70% of these neurons regardless of whether external Ca^{2+} was present or not (14/20; data not shown).

The best-described mechanism for receptor-mediated mobilization of intracellular Ca^{2+} stores is via activation of PLC isoforms (Sternweis and Smrcka, 1992). PLC catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, yielding 1,2-diaclylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3). Cytosolic IP_3 binds to its cognate receptor, releasing Ca^{2+} from intracellular pools. To determine whether D_2 receptors relied on a similar mechanism, neurons were dialyzed with the PLC inhibitor U-73122 ($10 \mu M$)

before D_2 receptor stimulation. U-73122 blocked the ability of NPA to reduce the slow, BAYK-enhanced tail currents in enkephalin-expressing neurons (Fig. 5C; $n = 9$; median modulation = 0%; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis). In contrast, non-L-type currents evoked by the depolarizing voltage step continued to be reduced by NPA (Fig. 5C; $n = 9$; median modulation = 19%; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis). Dialysis with the inactive analog U-73343 ($10 \mu M$) failed to alter the D_2 modulation of the tail currents ($n = 4$; median modulation = 21%; $p > 0.05$, Kruskal-Wallis). PLC β isoforms are generally thought to mediate receptor-driven responses like the ones observed here (Sternweis and Smrcka, 1992). The involvement of other PLC isoforms, like PLC γ , or tyrosine kinase itself (Diverse-Pierluissi et al., 1997) seems unlikely because of the inability of the tyrosine kinase inhibitor genistein ($50 \mu M$) to reduce the D_2 receptor modulation ($n = 3$; $p > 0.05$, Kruskal-Wallis) (Lajiness et al., 1993; Rhee and Bae, 1997). There are four

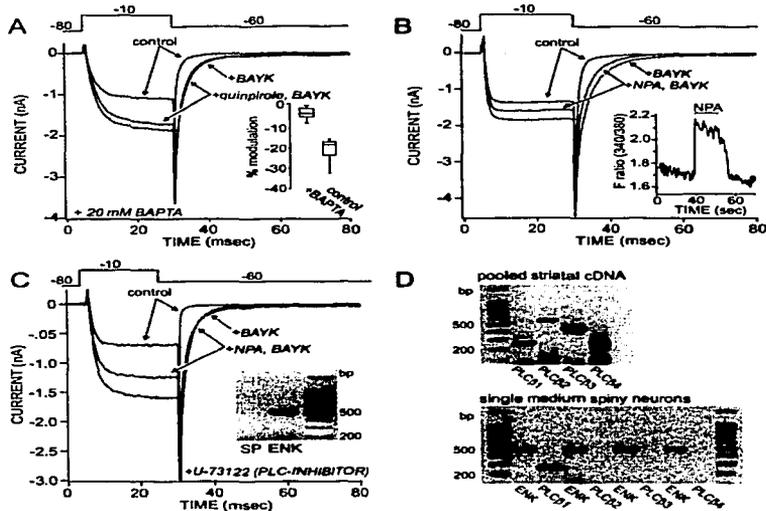


Figure 5. D_2 receptor modulation depends on the release of intracellular Ca^{2+} via a PLC-dependent mechanism. **A**, Dialysis with BAPTA (20 mM) blocked the D_2 modulation of tail currents but not peak currents ($n = 5$). Voltage protocol is shown at the top. **Inset**, A box plot summarizes the modulations seen with BAPTA internals ($n = 5$) and matched controls (BAPTA) ($n = 10$). **B**, NPA (10 μ M) reduced BAYK tail currents and increased intracellular Ca^{2+} levels in the same cells. **Inset**, The ratio of 510 nm fura-2 emission after excitation at 340 and 380 nm in the same neuron is shown. Measurements were taken while the cell was clamped at -80 mV and in the absence of external Ca^{2+} . **C**, NPA failed to modulate slow tail currents in enkephalin-expressing neurons dialyzed with the PLC inhibitor U-73122 ($n = 9$). **Inset**, The recorded neuron expressed enkephalin but not substance P. **D**, **Top**, The gel shows RT-PCR amplicons for PLCB1–4 in pooled striatal mRNA. **Bottom**, The gel shows representative amplicons from four ENK-positive medium spiny neurons. Only PLCB1 mRNA was detected in ENK neurons ($n = 20$).

isoforms of PLC β (1–4) that have been cloned (Exton, 1997). All four isoforms were expressed in pooled striatal tissue (Fig. 5D, top); however, when the RT-PCR analysis was limited to neurons expressing enkephalin mRNA, only the PLC β 1 isoform was detected (Fig. 5D, bottom).

These findings are consistent with the hypothesis that D_2 receptors activate PLC β 1. PLC β 1, like the other PLC β isoforms, is capable of being activated by $G_{\beta\gamma}$ subunits (Exton, 1997; Morris and Scarlata, 1997). To test whether D_2 receptors activated PLC β 1 in this way, neurons were dialyzed with an inhibitor of $G_{\beta\gamma}$ signaling (β ARK-C peptide; 1 mg/ml) (Koch et al., 1994). β ARK-Cp effectively inhibited the NPA modulation of the BAYK-enhanced, L-type tail currents, as well as the peak current, in enkephalin-expressing neurons (Fig. 6A). The median modulation of the slow tail currents in the presence of β ARK-Cp was 6% (Fig. 6B, inset; $n = 5$; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis). The NPA modulation of the currents evoked by the depolarizing voltage step was also 6% ($n = 5$; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis). In the same β ARK-Cp-dialyzed neurons, $G_{\alpha q}$ -linked M1 muscarinic receptors continued to reduce both peak and slow tail currents (Fig. 6B, inset) (Howe and Surmeier, 1995).

Inhibition of calcineurin blocks the D_2 receptor modulation of L-type Ca^{2+} currents

PLC β isoforms regulate intracellular Ca^{2+} levels via the production of IP $_3$. Dialysis with competitive antagonists of IP $_3$ (heparin, 10 mg/ml; $n = 6$; xestospingonin, 1 μ M; $n = 13$) (Simpson et al., 1995; Gafni et al., 1997) antagonized NPA effects on L-type channels in enkephalin-expressing neurons ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis). Lastly, caffeine (10 mM; externally applied), which is known to promote the release from ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores and inhibit IP $_3$ -mediated Ca^{2+} release (Simpson et al., 1995), induced an elevation in cytosolic Ca^{2+} levels and occluded the effects of quinpirole on FPL 64176-enhanced tail currents ($n = 10$; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis). One potential means by which elevations in cytosolic Ca^{2+}

levels could suppress L-type Ca^{2+} currents is via the Ca^{2+} -dependent phosphatase calcineurin (Chad and Eckert, 1986). To test this possibility, neurons were dialyzed with a peptide inhibitor of calcineurin (25 μ M) (Hashimoto et al., 1990). As shown in Figure 6C, the calcineurin inhibitor significantly reduced the NPA modulation of the BAYK-enhanced tail currents in enkephalin-expressing neurons ($n = 4$; median modulation = 5%; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis) without blocking the modulation of non-L-type currents (median modulation = 15%; $p < 0.05$, Kruskal–Wallis). In contrast, inhibition of protein phosphatase 1 and 2A with okadaic acid (1 μ M) had no effect on the ability of D_2 agonists to suppress the BAYK-enhanced tail current ($n = 2$; median modulation = 20%; $p > 0.05$, Kruskal–Wallis).

D_2 receptor activation suppresses spike activity evoked from depolarized membrane potentials

L-type Ca^{2+} currents are important determinants of evoked spike activity in medium spiny neurons (Hernández-López et al., 1997). The influence of these currents can be seen by holding medium spiny neurons at a depolarized level, close to that seen in the upstate *in vivo*. At this potential, a brief current pulse is capable of triggering a prolonged depolarization (hundreds of milliseconds) that occasionally results in spike generation. This type of response was seen in approximately two-thirds of all trials with a given neuron; in the other trials, the membrane potential decayed passively back to the “resting” potential. In the presence of the L-type channel agonist BAYK 8644, this quasistable response was enhanced in duration and probability (Fig. 7A). Spikes become a much more common event in this situation as well. On the other hand, in the presence of the L-type channel antagonist nifedipine (5 μ M), the bistable behavior was almost entirely abolished, resulting in passive membrane responses in the vast majority of trials (Hernández-López et al., 1997). D_2 receptor stimulation also suppressed the bistable behavior. In the presence of quinpirole (10 μ M), the probability of evoking a sustained depolarization dropped

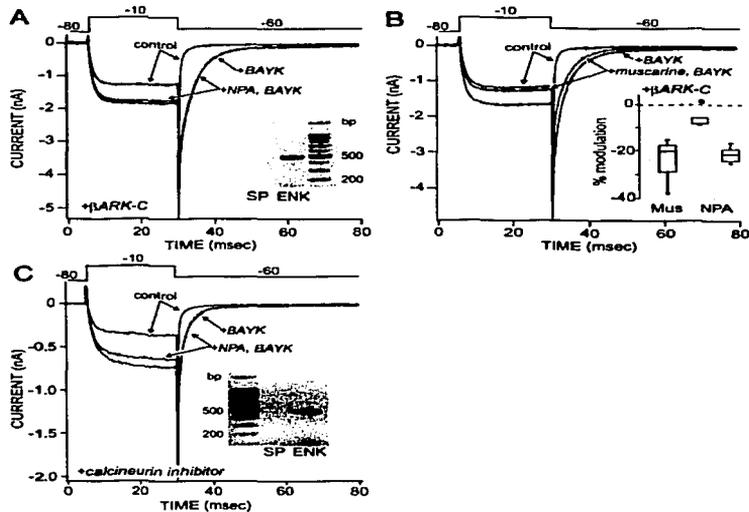


Figure 6. Inhibitors of G_{βγ} and calcineurin signaling attenuate the D₂ receptor modulation of L-type channels. **A**, Dialysis with BARK-C peptide (20 μM) blocked the NPA (10 μM) modulation of BAYK (1 μM)-enhanced tail currents, as well as peak evoked currents in enkephalin-expressing medium spiny neurons. **Inset**, The gel from the scRT-PCR profile is shown. The median modulation of the tail currents in enkephalin-expressing neurons (*n* = 4) was 4% (see **B**, inset box plot). **B**, In the same neuron depicted in **A**, muscarine (Mus; 1 μM) continued to modulate both currents evoked by the step to -10 mV and slow tail currents. **Inset**, The median muscarinic modulation of the tail currents was 20% in the presence of BARK-C. This was very similar to that seen previously (Howe and Surmeier, 1995) and indistinguishable from the D₂ modulation (see box plot; the asterisk is an outlier). Previous work has shown that these neurons express high levels of the G_α-linked M1 receptor. **C**, Dialysis with the calcineurin autoinhibitory peptide (25 μM) blocked the NPA modulation of the slow tail currents in enkephalin-expressing neurons but not that of the peak currents (*n* = 4). **Inset**, The gel shows ENK but not SP amplicons derived from the recorded neuron. Voltage protocol is shown at the top.

significantly (*n* = 6; *p* < 0.05, Kruskal-Wallis), even in the presence of BAYK 8644 (Fig. 7A).

D₂ receptor stimulation also shortened the duration of tetraethylammonium (TEA)-enhanced Ca²⁺ spikes in medium spiny neurons. When held at -60 mV in the presence of TEA (20 mM), a brief current stimulus evoked an all-or-none Ca²⁺ spike in medium spiny neurons (Kita et al., 1985; Bargas et al., 1989). In this recording situation, the duration of the Ca²⁺ spike was 210 ± 35 msec (mean ± SD; *n* = 40). If nicardipine (5 μM) or nifedipine (5 μM) were added, the Ca²⁺ spike was reduced in duration to 150 ± 40 msec (*n* = 15). As with the L-type channel antagonists, quinpirole (10 μM) reduced the duration of the TEA-induced Ca²⁺ spike in all three cells tested (mean duration = 160 ± 30 msec) (Fig. 7B, top). In the presence of nicardipine (5 μM), quinpirole failed to exert any further reduction of the Ca²⁺ spike in three of five neurons (Fig. 7B, bottom).

By providing a sustained depolarizing influence, L-type Ca²⁺ currents enhance repetitive activity evoked from depolarized membrane potentials in medium spiny neurons (Hernández-López et al., 1997). D₂ receptor-mediated suppression of these currents should diminish evoked spiking. Intracellular recordings from medium spiny neurons in tissue slices confirmed this conjecture. Neurons were slightly depolarized (approximately -65 mV) by steady current injection, and then repetitive activity was evoked by current steps. From these "upstate" membrane potentials, quinpirole (10 μM) diminished evoked spiking in 6 of 10 neurons (Fig. 7C). The suppression of repetitive activity was particularly evident with small current injections that come close to mimicking *in vivo* conditions (Fig. 7D, top). But, the reduction in firing frequency induced by quinpirole was evident via the whole intensity-frequency plot (Fig. 7D). In quinpirole-responsive neurons, the half-maximum frequency was reduced from 45 ± 10 to 33 ± 12 Hz by quinpirole (*n* = 6; *p* < 0.05, Kruskal-Wallis). The ability of quinpirole to alter evoked activity was suppressed by blockade of L-type channels with nicardipine (5 μM; *n* = 3). Taken together,

these results clearly argue that D₂ receptor modulation of L-type Ca²⁺ channels results in a suppression of repetitive spiking evoked from depolarized potentials in medium spiny neurons.

DISCUSSION

D₂ receptors in striatal medium spiny neurons activate a PLC-IP₃-calcineurin cascade

The results presented show that activation of D₂ receptors reduces currents through L-type Ca²⁺ channels, leading to a suppression of evoked spike activity in enkephalin-expressing striatal medium spiny neurons. Even though nearly all striatal effects of D₂ receptor activation are ascribed to the inhibition of adenylyl cyclase activity (Sibley, 1995), this signaling linkage was not responsible for the modulation of L-type Ca²⁺ channels. Manipulation of adenylyl cyclase activity, cAMP metabolism, and dialysis with a competitive inhibitor of cAMP had no effect on the modulation. Rather, the D₂ receptor modulation depended on G_{βγ} protein activation of a PLCβ1-signaling cascade, mobilization of intracellular Ca²⁺, and activation of calcineurin. This conclusion is based on five observations. First, the D₂ receptor suppression of L-type currents was blocked by inhibition of G_{βγ} signaling. Second, medium spiny neurons expressed readily detectable levels of PLCβ1 mRNA (but not that of other PLCβ isoforms), and the modulation was blocked by inhibitors of PLCβ1. Third, D₂ receptor stimulation induced the release of Ca²⁺ from intracellular stores. Fourth, disruption of IP₃ signaling or chelation of intracellular Ca²⁺ blocked the modulation. Lastly, inhibition of the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin blocked the modulation. Dephosphorylation by calcineurin has been shown to mediate reductions in L-type Ca²⁺ currents in a variety of cell types (Chad and Eckert, 1986; Armstrong et al., 1991; Lukyanetz et al., 1998). In an intact preparation, the D₂ receptor-triggered activation of calcineurin may act cooperatively with a direct Ca²⁺-calmodulin-mediated inactivation

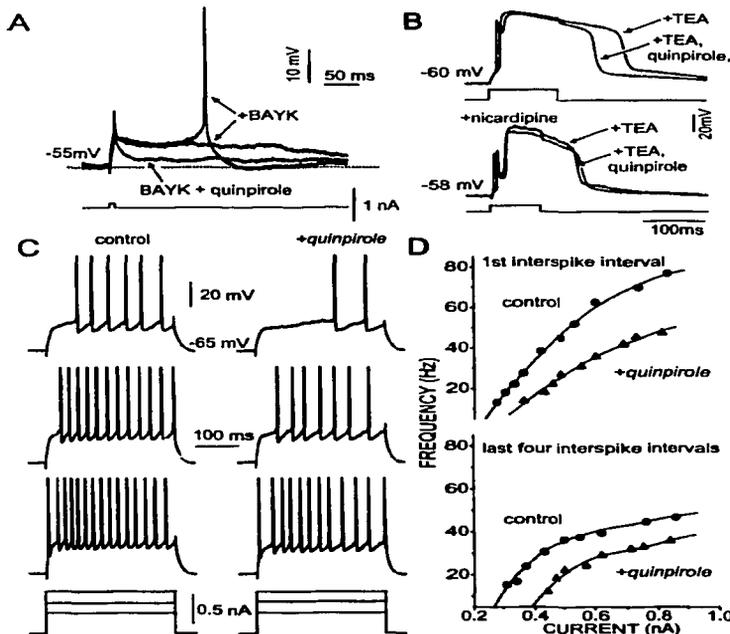


Figure 7. D₂ receptor stimulation suppresses evoked activity in medium spiny neurons recorded in brain slices. *A*, At depolarized membrane potentials mimicking the upstate in medium spiny neurons, a brief current pulse (see protocol below the traces) evokes a sustained depolarization in the presence of BAYK 8644 (2.5 μ M). The depolarization was significantly shortened by the addition of quinpirole (10 μ M). Similar results were seen in all six cells tested. *B*, Intracellular recordings from medium spiny neurons in the presence of TEA (20 μ M). The TEA spike was of shorter duration. The addition of quinpirole had little or no effect in the presence of nicardipine (median reduction = 2%; $n = 3$). *C*, Activity evoked by intracellular current injection from a depolarized (approximately -65 mV) membrane potential was suppressed by quinpirole. *Left*, Records evoked by increasing current steps (300 msec in duration) in control conditions are shown. *Right*, Records taken from the same cell after the addition of quinpirole (10 μ M) are shown. Note that in the presence of quinpirole, the discharge frequency decreased for similar current steps. *D*, Plots of discharge frequency as a function of injected current for the neurons in *C* are shown. *Top*, The plot is the frequency (reciprocal of first interspike interval) in the presence and absence of quinpirole (10 μ M). *Bottom*, The average of the last four interspike intervals in the evoked train in the presence and absence of quinpirole is shown. Similar results were obtained in five other responsive neurons.

process (Imredy and Yue, 1994; Peterson et al., 1999) to suppress currents through L-type Ca²⁺ channels further.

Although previous biochemical studies of striatal slices have not reported D₂ receptor stimulation of PLC (Gupta and Mishra, 1990; Rubinstein and Hitzemann, 1990), striatal cellular heterogeneity complicates the interpretation of these studies. Indiscriminate activation of striatal D₂ receptors can be expected to have two opposing effects. One is activation of PLC in enkephalinergic medium spiny neurons. The other is diminished acetylcholine release (Drukarch et al., 1990) and a reduction in M1 muscarinic receptor stimulation of PLC in medium spiny neurons (Akins et al., 1990; Bernard et al., 1992). Hence, there may be no net change in striatal PLC activity after global D₂ receptor activation. Although they have not provided a clear picture of the signaling mechanism, studies using heterologous expression systems have shown that D₂ receptors are capable of stimulating PLC and mobilizing intracellular Ca²⁺ pools (Vallar et al., 1990; MacKenzie et al., 1994; Yang et al., 1995).

The ability of striatal D₂ receptors to mobilize intracellular Ca²⁺ stores, reduce L-type Ca²⁺ channel currents, and suppress evoked activity effectively reconciles an apparently divergent set of observations. On one hand, D₂ receptor activation is known to increase striatal calcineurin and MAP kinase activity via Ca²⁺-dependent mechanisms (Nishi et al., 1997; Yan et al., 1999). On the other hand, blockade of D₂ receptors or diminished D₂ receptor tone is known to increase striatal immediate early gene (IEG) and peptide expression (Chesselet et al., 1998). D₂ receptor activation

also is necessary for certain forms of striatal use-dependent synaptic plasticity (Calabresi et al., 1992). Our results directly demonstrate calcineurin activation by D₂ receptors and provide a mechanism for Ca²⁺-dependent MAP kinase activation. Calcineurin-mediated suppression of L-type Ca²⁺ currents will reduce glutamate-induced CRE-binding protein phosphorylation and IEG induction (Rajadhyaksha et al., 1999). By the same token, this D₂ receptor-signaling pathway provides a ready alternative to disinhibition of adenylyl cyclase (Ward and Doran, 1999) in explaining the ability of D₂ receptor antagonists to increase sharply striatal IEG induction after cortical stimulation (Berretta et al., 1999).

D₂ receptor activation selectively suppresses activity in enkephalin-expressing medium spiny neurons

In addition to reconciling these more recent observations, our results provide the first direct evidence for one of the oldest conjectures about dopaminergic regulation of striatal activity, namely, that D₂ receptor activation selectively suppresses the activity of enkephalin-expressing medium spiny neurons (Albin et al., 1989). This conjecture has served as a cornerstone of basal ganglia models and treatment strategies for Parkinson's disease for over a decade. Yet, the evidence for this conjecture has been indirect or inconclusive (Nicola et al., 2000).

Our results show that D₂ receptor stimulation inhibits activity evoked from relatively depolarized membrane potentials, mimicking the upstate produced by excitatory cortical or thalamic inputs

(Wilson and Kawaguchi, 1996). *In vivo*, medium spiny neurons move between this depolarized upstate in which they generate spikes and a hyperpolarized "downstate" in which they are quiescent. Although other voltage-dependent channel types are modulated in concert (Surmeier et al., 1992; Surmeier and Kitai, 1993; Waszczak et al., 1998), the D₂ receptor suppression of L-type Ca²⁺ currents is critical to this inhibition of activity. Why? Unlike N- and P/Q-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in medium spiny neurons, L-type channels are active in the subthreshold potential range of the upstate (Bargas et al., 1994; Song and Surmeier, 1996). This property allows them to exert an important influence on the membrane potential near spike threshold, pushing the membrane potential closer or pulling it farther away from spike generation. Medium spiny neurons expressing D₂ receptors use this property of L-type Ca²⁺ currents to enhance evoked activity in the presence of dopamine (Surmeier et al., 1995; Hernandez-Lopez et al., 1997). In contrast, activation of D₂ receptors in enkephalin-expressing neurons should reduce both the magnitude and duration of the response to cortical or thalamic excitatory synaptic input, as predicted over a decade ago by Albin et al. (1989). Moreover, by targeting a Ca²⁺ channel with privileged access to transcriptional regulation (Bading et al., 1993; Graef et al., 1999; Mermelstein et al., 2000), D₂ receptors exert a proximal control over gene expression tied to extrinsically driven activity. This proximal coupling may prove to be very important to long-term striatal adaptations triggered by alterations in dopaminergic signaling in Parkinson's disease, prolonged neuroleptic treatment, and drug abuse (Hornykiewicz, 1973; Meltzer and Stahl, 1976; Nestler and Aghajanian, 1997).

REFERENCES

- Akins PT, Surmeier DJ, Kitai ST (1990) The M1 muscarinic acetylcholine receptor in cultured rat neostriatum regulates phosphoinositide hydrolysis. *J Neurosci* 10:66–77.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375.
- Armstrong DL, Rossier MF, Scherbatko AD, White RE (1991) Enzymatic gating of voltage-activated calcium channels. *Ann NY Acad Sci* 635:26–34.
- Bading H, Ginty DD, Greenberg ME (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260:181–186.
- Baranuskas G, Tkatch T, Surmeier DJ (1999) Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 (Kv4) channels. *J Neurosci* 19:6394–6404.
- Bargas J, Galarraga E (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 75:146–156.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Sag Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of D₂ receptor-expressing, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667–6686.
- Battaglia G, Norman AB, Hess EJ, Creese I (1985) D₂ dopamine receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in rat striatum. *Neurosci Lett* 59:177–182.
- Bernard V, Normand E, Bloch B (1992) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci* 12:3591–3600.
- Bernheim L, Beech DJ, Hille B (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 6:859–867.
- Berreita S, Sachs Z, Graybiel AM (1999) Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D₂-class receptor blockade. *Eur J Neurosci* 11:4309–4319.
- Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992) Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 12:4224–4233.
- Chad JE, Eckert R (1986) An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed Helix neurons. *J Physiol (Lond)* 378:31–51.
- Chesselet MF, Celis JM, Mackenzie JL (1998) Dopamine control of gene expression in basal ganglia nuclei: striatal and nonstriatal mechanisms. *Adv Pharmacol* 42:674–677.
- Diverse-Pierluissi M, Remmers EA, Neubig RR, Dunlap K (1997) Novel form of creatine kinase G protein and tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5417–5421.
- Drukarch B, Schepens E, Stoof JC (1990) Muscarinic receptor activation attenuates D₂ dopamine receptor mediated inhibition of acetylcholine release in rat striatum: indications for a common signal transduction pathway. *Neuroscience* 37:1–12.
- Exton JH (1997) Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur J Biochem* 243:10–20.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN (1997) Xestospogins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19:729–733.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15:285–320.
- Graef LA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW (1999) Calcineurin and GSK-3 β are essential for dopamine to regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401:703–708.
- Gupta SK, Mishra RK (1990) The effect of dopamine D₁ and D₂ receptor agonists on inositol phosphate turnover in rat striatal slices. *Biochem Int* 19:487–494.
- Hashimoto Y, Perrino BA, Soderling TR (1990) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J Biol Chem* 265:1924–1927.
- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D₂ receptor activation evokes a calcium current charge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342.
- Hornykiewicz O (1973) Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications. *Br Med Bull* 29:172–178.
- Howe AR, Surmeier DJ (1995) Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* 15:458–469.
- Imredy JP, Yue DT (1994) Mechanism of Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 12:1301–1318.
- Kitai H, Kita T, Kitai ST (1985) Regenerative potentials in rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. *Exp Brain Res* 60:63–70.
- Koch WJ, Hawes BE, Ingelse J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1994) Cellular expression of the protein tyrosine kinase β attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* 269:6193–6197.
- Lajiness ME, Chio CL, Huff RM (1993) D₂ dopamine receptor stimulation increases tyrosine phosphorylation in rat neostriatum: relationship to dopamine stimulation of tyrosine phosphorylations. *J Pharmacol Exp Ther* 267:1573–1581.
- Lukyanetz EA, Piper TP, Sihra TS (1998) Calcineurin involvement in the regulation of nuclear cAMP response element protein expression in rodent neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Physiol (Oxf)* 110:371–385.
- MacKenzie RG, VanLeeuwen D, Pugsley TA, Shih YH, Demattos S, Tang L, Todd RD, O'Malley KL (1994) Characterization of the human dopamine D₂ receptor expressed in transfected cell lines. *Eur J Pharmacol* 266:79–85.
- Meltzer HY, Stahl SM (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2:19–76.
- Mermelstein PG, Foschering RC, Tkatch T, Song WJ, Baranuskas G, Surmeier DJ (1999) Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with beta subunit expression. *J Neurosci* 19:7268–7277.
- Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (2000) Critical dependence of cAMP response element protein expression on activation of L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* 20:266–273.
- Morris AJ, Scarlata S (1997) Regulation of effectors by G-protein alpha and beta gamma subunits: new insights from studies on the phospholipase C-beta isoenzymes. *Biochem Pharmacol* 54:429–435.
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58–63.
- Nishi A, Surmeier DJ, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185–215.
- Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997) Bidirectional regulation of D₂ receptor phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17:8147–8155.
- Peterson BZ, DeMeo CD, Adelman JP (1990) G-protein is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22:549–558.
- Rajadhyaksha A, Barczak A, Macias W, Leveque JC, Lewis SE, Konradi C (1996) L-type Ca²⁺ channels are essential for glutamate-stimulated CREB phosphorylation and c-fos gene expression in striatal neurons. *J Neurosci* 19:6348–6359.
- Rampe D, Anderson B, Rapin P, Fryer V, Li T, Dage RC (1993) Comparison of the *in vitro* and *in vivo* cardiac actions of two structurally distinct Ca²⁺ channel activators, BAY K 8644 and EPL 64176. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1125–1130.
- Rhee SG, Bae YS (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C- β by tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 227:1504–1506.
- Rubinstein JE, Hitzemann RJ (1990) Further evidence against the coupling of dopamine receptors to phosphoinositide hydrolysis in rat striatum. *Biochem Pharmacol* 39:1965–1970.
- Sanson DR (1993) Gift of gab: the neuroleptic syndrome: a neuropsychiatric disorder. *J Psychosom Res* 37:211–226.
- Sibley DR (1995) Molecular biology of dopamine receptors. In: *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function* (Ariano MA, Surmeier DJ, eds), pp 255–272. Austin, TX: Landes.
- Simons DJR, Chailionis A, Nabors SL (1995) Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci* 18:299–306.

- Song W-J, Surmeier DJ (1996) Voltage-dependent facilitation of calcium currents in rat neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 76:2290–2306.
- Sternweis PC, Smrcka AV (1992) Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci* 17:502–506.
- Surmeier DJ, Kitai ST (1993) D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. In: *Chemical signaling in the basal ganglia* (Arbuthnot GW, Emson PC, eds), pp 309–324. Amsterdam: Elsevier.
- 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 USA* 89:10178–10182.
- Surmeier DJ, Bargans J, Hemmings Jr HC, Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385–397.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579–6591.
- Tukey JW (1977) *Exploratory data analysis*. Menlo Park, CA: Addison-Wesley.
- Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O (1990) Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in Ltk-fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 265:10320–10326.
- Viard P, Exner T, Maier U, Mironneau J, Nurnberg B, Marez N (1999) Gbetagamma dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J* 13:685–694.
- Ward RP, Dorsa DM (1999) Molecular and behavioral effects mediated by G_s-coupled adenosine A_{2a}, but not serotonin 5-HT₄ or 5-HT₆ receptors following antipsychotic administration. *Neuroscience* 89:927–938.
- Waszczak BL, Martin LP, Greif GJ, Freedman JE (1998) Expression of a dopamine D2 receptor-activated K⁺ channel on identified striatopallidal and striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11440–11444.
- Weiss S, Sebben M, Garcia-Sainz JA, Bockaert J (1985) D2-dopamine receptor-mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. *Mol Pharmacol* 27:595–599.
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397–2410.
- Yan Z, Song WJ, Surmeier J (1997) D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77:1003–1015.
- Yan Z, Feng J, Fienberg AA, Greengard P (1999) D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11607–11612.
- Yang SN, Dasgupta S, Lledo PM, Vincent JD, Fuxe K (1995) Reduction of dopamine D2 receptor transduction by activation of adenosine A_{2a} receptors in stably A_{2a}/D2 (long-form) receptor co-transfected mouse fibroblast cell lines: studies on intracellular calcium levels. *Neuroscience* 68:729–736.

APARTADO 2.

El papel de las diferentes conductancias de calcio en el disparo repetitivo de la neurona espinosa mediana; implicaciones para la modulación de los receptores dopaminérgicos tipo D2.

Los receptores dopaminérgicos, al igual que otros receptores de tipo metabotrópico en el sistema nervioso central, regulan el flujo de calcio al medio intracelular. Estas corrientes catiónicas entrantes juegan un papel importante en la excitabilidad de la NEM.

Como se mencionó en la parte introductoria de esta tesis, diferentes tipos de corrientes de calcio han sido descritas en las NEMs. En el artículo que a continuación se anexa se estudió detalladamente la implicación directa de bloquear selectivamente diferentes conductancias de calcio en el disparo repetitivo de la célula.

El bloqueo selectivo de las conductancias de calcio tipo L tuvo resultados opuestos a los observados como consecuencia de bloquear selectivamente las conductancias de calcio tipo N y P/Q, en la excitabilidad de las neuronas.

Los resultados descritos en este trabajo son de gran utilidad para entender y explicar la acción de los receptores D2.

The role of Ca^{2+} channels in the repetitive firing of striatal projection neurons

Enrique Pérez-Garci, José Bargas and Elvira Galarraga^{CA}

Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, PO Box 70-253, México, D.F. México 045 10

^{CA}Corresponding Author: egalarra@ifc.unam.mx

Received 19 March 2003; accepted 1 April 2003

Blockade of L-type Ca^{2+} channels results in a decrease in firing frequency of neostriatal neurons. In contrast, N- and P/Q-types of Ca^{2+} channel cooperate to tune firing pattern, since both of these channel types have to be blocked to enhance firing frequency. Parameters of the intensity–frequency plot were differentially modified by Ca^{2+} channel antagonists: while L-type Ca^{2+} channel block reduced the dynamic range by about

80%, block of N- and P/Q-types of Ca^{2+} channel generated a steeper intensity–frequency plot. These effects are explained in terms of the sustained depolarization and the afterhyperpolarizing potential known to be dependent upon L- and N-, P/Q-types of Ca^{2+} channels, respectively. *NeuroReport* 14:1253–1256 © 2003 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Afterhyperpolarization; Calcium channels; Firing frequency; L-type; N-type; P/Q-types; Striatum

INTRODUCTION

Ion conductances determine the firing pattern of neurons [1,2]. Ca^{2+} influx into neostriatal projection neurons plays an important role in tuning firing frequency [3], in part by activating K^{+} conductances [4]. Ca^{2+} currents in spiny neurons are mediated by L-, N-, R- and P/Q-type Ca^{2+} channels [5,6]. α_{1C} and α_{1D} subunits give rise to functional L-type currents ($\text{Cav}1.2$; $\text{Cav}1.3$) [7–9], which are modulated by cAMP-dependent phosphorylation [10] and blocked by dihydropyridines [5,8]. L-type Ca^{2+} currents provide spiny neurons with slow depolarizations modulated by dopamine receptors [11–13]. α_{1A} and α_{1B} subunits express functional P/Q- ($\text{Cav}2.1$) and N-type ($\text{Cav}2.2$) Ca^{2+} currents in spiny neurons [5,6,8,9], which are blocked by ω -agatoxin TK (agatoxin) [14] and ω -conotoxin GVIA (conotoxin) [5,8,15], respectively. Ca^{2+} entering through $\text{Cav}2.1$ and $\text{Cav}2.2$ channels preferentially activate Ca^{2+} -dependent K^{+} currents that underlie the afterhyperpolarization (AHP) [16]. AHP reduction could be involved in changes in firing frequency [17,18]. Ca^{2+} entering the cell in a segregated and specialized fashion may promote different physiological events [19–21]. However the impact of different Ca^{2+} conductances on the sustained repetitive firing of a given neuron has not been systematically studied by constructing intensity–frequency plots (I-F plots). The present experiments show that selective blockade of L- or N- and P/Q-type Ca^{2+} currents have opposite effects on repetitive firing by affecting different parameters of the I-F plot.

MATERIALS AND METHODS

Methods have been reported elsewhere [12]. Briefly, 30-day-old male Wistar rats were anaesthetised and decapi-

tated, and their brains were removed and submerged in an ice saline solution containing (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 and 11 glucose (33–35°C, 300 mOsm/l with glucose, pH 7.4, after bubbling with 95% O_2 /5% CO_2). Parasagittal slices were cut at 350 μm on a vibratome and let to rest for 1 h at room temperature in the same saline. Thereafter, slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused with the same saline at 33–35°C. Intracellular recordings were performed from spiny neurons of the dorsal neostriatum using sharp electrodes filled with potassium-acetate 3 M and 1% biocytin (d.c. resistance 80–120 M Ω). Records were obtained with an active bridge electrometer (Neuro Data, Cygnus Technology, Inc, Delaware Water Gap, PA), digitized, and saved on video tapes (40 kHz) for off-line analysis with a personal computer. After recordings, neurons were injected with biocytin for its anatomical identification. All of the neurones presented here were medium spiny neostriatal projection neurons. Ca^{2+} channel blockers were bath applied and consisted of (in μM): 2.5 nifedipine, 2.5 nitrendipine (Sigma St. Louis MO), 1.0 ω -conotoxin GVIA 0.4 ω -agatoxin TK, and 1 calcisepetine (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Experiments were paired, so that records in the presence and absence of bath-applied drugs were compared in the same neuron with non-parametric statistics (Systat v.7. SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Blockade of L-type Ca^{2+} conductances decreased firing frequency: The impact of selectively blocking L-type Ca^{2+} conductances was evaluated during firing. Neurons were depolarized (≈ -65 mV) by steady current steps (± 300 ms; Fig. 1a). The intensity of such steps was gradually in-

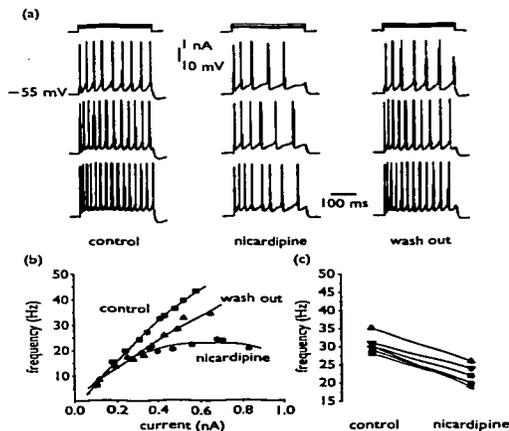


Fig. 1. Effects of L-type Ca^{2+} conductance block on repetitive firing. (a) Representative trains of actions potentials evoked by current steps of increasing strength (top) obtained from the same cell in control (left), during nicardipine ($2.5 \mu\text{M}$; middle) and after washing out the calcium blocker (right). Current strength was similar in all three cases. (b) Graph of the firing frequency (reciprocal of mean last four inter spike intervals) as a function of current strength (I-F plot). (c) Paired line plot showing variation in frequency measured at half I-F plot in the whole sample.

creased to elicit trains of action potentials at different frequencies (Fig. 1a, left column). I-F plots were constructed with these records (Fig. 1b). Bath-applied nicardipine ($2.5 \mu\text{M}$), a selective L-type Ca^{2+} channel blocker, reduced firing frequency and increased frequency adaptation at similar current intensities (Fig. 1a, middle column). Frequency measured at half-maximal recorded frequency (using last four inter spike intervals) was significantly reduced in all cells tested from (mean \pm s.e.m.) 33 ± 3.5 in the control to 22 ± 1.2 Hz in nicardipine (Fig. 1c; $n = 6$; $p < 0.03$, Wilcoxon's T) or a $32 \pm 5\%$ decrease. This effect was reversible (Fig. 1a, right column). Moreover, the I-F plot (Fig. 1b) exhibited a decreased initial slope and a compressed dynamic range during nicardipine. Current strength to evoke minimal frequency had to be increased during nicardipine (see Fig. 1b) from 0.12 ± 0.02 nA to 0.38 ± 0.13 nA ($p < 0.03$; Wilcoxon's T). Minimal frequency was increased from 7.5 ± 1 Hz to 16.5 ± 1.7 Hz ($p < 0.03$; Wilcoxon's T) whereas maximal frequency was reduced (Fig. 1b) from > 40 Hz to 24 ± 3 Hz (Fig. 1b), rendering in a great divergence of control vs test I-F plots. The net effect was a 4-fold compression of the mean dynamic range, as a minimum (since maximal frequencies were not attained in order to preserve cell integrity) from 7.5–40 Hz in the

controls to 16.5–24 Hz in nicardipine. Calciseptine ($1 \mu\text{M}$; $n = 3$) and nifedipine ($n = 3$), other selective L-type Ca^{2+} channel blockers, had similar effects.

Blockade of N- and P/Q-type Ca^{2+} conductances increased firing frequency: In another set of experiments, the simultaneous addition of N- and P/Q-type channels blockers, conotoxin ($1 \mu\text{M}$) and agatoxin ($0.4 \mu\text{M}$), increased the mean half recorded firing frequency of spiny neurons (Fig. 2a) from 29 ± 1.3 Hz in controls to 40 ± 1.7 Hz in the presence of the Ca^{2+} channel antagonists in all cells tested (Fig. 2b,c; $n = 5$; $p < 0.05$, Wilcoxon's T). This amounted to $38 \pm 3\%$ of mean frequency increase. Steeper I-F plots (Fig. 2b) and larger maximal frequencies for the same stimulus strength were produced by the action of these peptides. However, minimal frequency did not change and a great divergence between I-F plots, as that observed for L-type Ca^{2+} channel blockade, was not seen. It is worth noting that the addition of each toxin separately, had only weak effects in firing frequency (data not shown). Agatoxin alone had a clear mild increase in firing frequency in only one of four neurons.

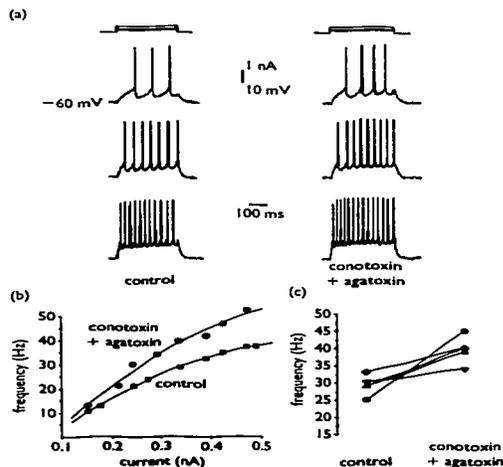


Fig. 2. Effects of N- and P/Q-type Ca^{2+} conductance block on repetitive firing. (a) Representative trains of actions potentials evoked by current steps of increasing strength (top) obtained from the same cell in control (left) and during a mixture of ω -conotoxin GVIA ($1 \mu\text{M}$) plus ω -agatoxin TK ($0.4 \mu\text{M}$; right). Current strength was similar in both cases. (b) I-F plots in both conditions. (c) Paired line plot showing variation in frequency measured at half I-F plot in the whole sample.

Calcium influx regulates firing threshold and AHP: To explain why the blockade of L-type Ca^{2+} channels decreased the dynamic range and forced an increase in stimulus strength to produce firing (Fig. 1), we compared the responses to weak step stimuli before and during nicardipine (Fig. 3a). Thus, a depolarizing current step that evoked two action potentials was unable to evoke them when nicardipine was added to the extracellular medium. The trajectory of the voltage response moved away from spike threshold (Fig. 3a). As a result, no firing was evoked by the same current strength. Nicardipine effects were reversible. Figure 3c shows that post-train AHP amplitude was only slightly reduced (a mean of $15 \pm 3\%$; $n=6$; $p < 0.05$, Wilcoxon's T) by nicardipine. Trains with the same number of action potentials were compared. Therefore, mild effects on the AHP did not counteract the effect on voltage threshold and depolarization. It is suggested that the slow depolarization these neurons exhibit at less negative potentials [12] may have the same origin as this subliminal depolarization.

On the other hand, superfusion of agatoxin plus conotoxin neither affected voltage trajectory toward firing threshold (Fig. 3b) nor current or voltage thresholds. However it reduced the AHP that follows a single AHP [16] and moreover, the AHP that follows a train of action potentials by about $40 \pm 11\%$ (Fig. 3d; $n=5$; $p < 0.05$; Wilcoxon's T).

DISCUSSION

The present study shows opposite actions of Cav1 and Cav2 classes of channels on firing frequency of neostriatal neurons. L-type Ca^{2+} channels enhance whereas N- and P/Q-type channels decrease firing frequency. Slow sustained depolarizations that outlast the stimulus may sustain repetitive firing in spiny cells [11–13]. This behaviour is indicative of subthreshold inward currents [2]. Accordingly, the present experiments show that L-type Ca^{2+} channel block decreases firing frequency. This blockade collapsed the I-F plot which exhibited a dramatic reduction in slope and maximal frequency with a concomitant in-

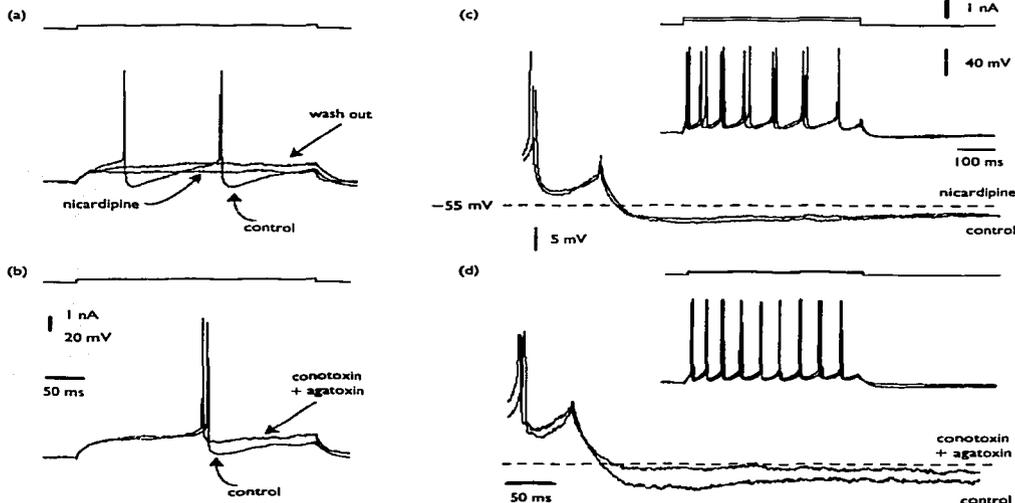


Fig. 3. Ca^{2+} conductances regulate either threshold or AHP. (a) Superimposed responses to depolarising intracellular current pulses of constant strength (0.11 nA) before, during and after washing out nicardipine (2.5 μM). Nicardipine moves the voltage response away from firing threshold. (b) In contrast to nicardipine, a mixture of ω-conotoxin GVIA (1 μM) plus ω-agatoxin TK (0.4 μM) did not change the voltage trajectory towards firing. However, the mixture reduced the amplitude of the AHP. (c) Superimposition of two AHPs following two trains of ten action potentials (inset), before and during nicardipine (2.5 μM). Applied current stimuli show that a stronger stimulus was necessary to achieve the same number of action potentials during nicardipine (inset top). (d) Same procedure as in (c) showing that the mixture of ω-conotoxin GVIA plus ω-agatoxin TK reduced the AHP. Current stimulus was adjusted to evoke the same number of action potentials.

crease in minimal frequency. Blockade of L-type Ca^{2+} channels may have rendered a predominance of subthreshold K^{+} conductances [2,22], increasing voltage threshold. This was reflected as both an increase in the current strength to attain minimal firing rate and in the actual minimal firing rate. In summary, the dynamic range was reduced to about 20% of its original value when L-type channels were blocked (Fig. 1b). It is concluded that the dynamic firing range of neostriatal spiny neurons depends on L-type Ca^{2+} conductances (probably α_{1D}) [5,8]. In contrast, the AHP was only slightly reduced by L-type Ca^{2+} channel blockade. Although this had been described for AHPs following a single spike [16], the present work generalized this finding for cumulative AHPs generated after a train of spikes (Fig. 3c).

N- and P/Q-type Ca^{2+} conductances regulated AHP amplitude. This AHP is largely mediated by amine-sensitive (SK) and iberiotoxin-sensitive (BK) Ca^{2+} -activated K^{+} -currents [4,18]. Furthermore, the major Ca^{2+} source to activate these conductances comes from N- and P/Q-type Ca^{2+} channels [16]. It could then be inferred that the blockade of any of these channel types, N or P/Q, would change firing frequency, as it is the case of synaptic transmission, where the blockade of any of these channel types reduces transmitter release [23]. However, this logical inference was not supported by the experiments. We failed to alter firing frequency in several instances in which only one of the peptidic antagonists, conotoxin or agatoxin, was administered. However, when both peptides were administered together firing frequency increased and cumulative AHP decreased. Therefore, there is a need to block both Ca^{2+} channel types in order to achieve significant effects on repetitive firing. To our knowledge, this kind of cooperation between Ca^{2+} -conductances, to tune firing pattern, has not been previously reported. This would be an essential cooperation as opposed to the redundant cooperation found in synaptic terminals [23] where the block of any channel type is enough to affect transmission since it superimposes to the effect of other channel types making the sum of the effects > 100% (superadditivity) [23].

A prediction is that a transmitter has to block significantly, both channel types, to show any relevant modulation of AHP and patterning. Alternatively, synergies between transmitters are possible. I-F plots became steeper after AHP blockade (less current was needed to reach the same frequencies) but a large divergence between I-F plots was not seen.

In conclusion, N- and P/Q-type Ca^{2+} conductances regulate the slope of the I/O function whereas L-type Ca^{2+} conductances regulate both the slope and the dynamic range. Variation is about 100% at high frequencies indicating that modulation may greatly vary the response of these cells. Ca^{2+} -conductances should be conceived as regulators of different parameters of the I/O function

(slope, range) and not just excitatory or inhibitory. This endows the system with great non-linear capabilities, since different Ca^{2+} -currents in neostriatal spiny cells are differentially modulated by transmitters [12,13,24].

CONCLUSIONS

The knowledge of transmitters and drugs that reduce or enhance different types of Ca^{2+} -conductances is rapidly increasing. These drugs and transmitter analogues are important therapeutically, since they bring the opportunity to regulate specific cellular functions. This work shows that blockade of N- and P/Q-type Ca^{2+} conductances facilitates repetitive firing by increasing the slope of the I/O function. On the other hand, blockade of L-type Ca^{2+} conductance decreases repetitive firing by controlling the extent of the dynamic range. These opposing roles for quite similar conductances is counterintuitive and likely to differ in different neuronal classes. This type of study aims to set the basis for a better understanding of drug and transmitter actions.

REFERENCES

- Llinás RR. *Science* 242, 1654–1664 (1988).
- Bargas J, Cervantes L, Galarraga E and Fraguera A. Ion channels, keys to neuronal specialization. In: Arbib MA, ed. *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*. Cambridge MA: MIT Press; 2003, pp. 585–590.
- Galarraga E, Bargas J, Sierra A and Aceves J. *Exp Brain Res* 75, 157–168 (1989).
- Bargas J, Ayala CX, Vilchis C et al. *Neuroscience* 88, 479–488 (1999).
- Bargas J, Howe A, Eberwine J et al. *J Neurosci* 13, 6667–6686 (1994).
- Mermelstein PJ, Foehring RC, Tkatch T et al. *J Neurosci* 19, 7268–7277 (1999).
- Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP and Gilbert MM. *Neuron* 7, 45–57 (1991).
- Cantrell AR, Carter-Russell H, Mermelstein P and Surmeier DJ. Ca^{2+} and Na^{+} currents in acutely-isolated neostriatal neurons from the rat. In: Ariano M and Surmeier DJ, eds. *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function*. Austin TX: NUL, Springer-Verlag; 1995, pp. 151–163.
- Catterall WA. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16, 521–555 (2000).
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC et al. *Neuron* 14, 385–397 (1995).
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A et al. *Neuroreport* 8, 2183–2186 (1997).
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ et al. *J Neurosci* 17, 3334–3342 (1997).
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-García E et al. *J Neurosci* 20, 8987–8995 (2000).
- Teramoto T, Niidome T, Kimura M et al. *Brain Res* 756, 225–230 (1997).
- Williams ME, Brust PF, Feldman DH et al. *Science* 257, 389–395 (1992).
- Vilchis C, Bargas J, Ayala CX et al. *Neuroscience* 93, 745–752 (2000).
- Soren JF. *Prog Brain Res* 83, 161–187 (1990).
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J et al. *J Neurophysiol* 68, 287–294 (1992).
- Houngaard J and Kiehn O. *J Physiol* 468, 245–259 (1993).
- Sah P. *Proc R Soc Lond* 260, 105–111 (1995).
- Davies PJ, Ireland DR and McLachlan EM. *J Physiol* 495, 353–366 (1996).
- Bargas J, Galarraga E and Aceves J. *Exp Brain Res* 75, 146–156 (1989).
- Wu LG and Saggau P. *Trends Neurosci* 20, 204–212 (1997).
- Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J and Galarraga E. *Eur J Pharmacol* 281, 271–277 (1995).

Acknowledgements To Dagoberto Tapia for expert technical assistance. This work was supported by grants from DGAPA-UNAM IN20100, CONACYT 31839-N and The Millennium Research Initiative, W-8072/35806-N.

DOI: 10.1097/01.wnr.0000081861.45938.71

La nicardipina ocluye la acción moduladora de los receptores D2.

Como se describió en el artículo, el bloqueo de las conductancias de calcio tipo L, mimetizó la acción de los receptores D2 sobre la frecuencia de disparo de la NEM. Si estos últimos ejercen su acción disminuyendo las conductancias tipo L, se esperaría que los efectos de la nicardipina ocluyeran la modulación de los agonistas D2.

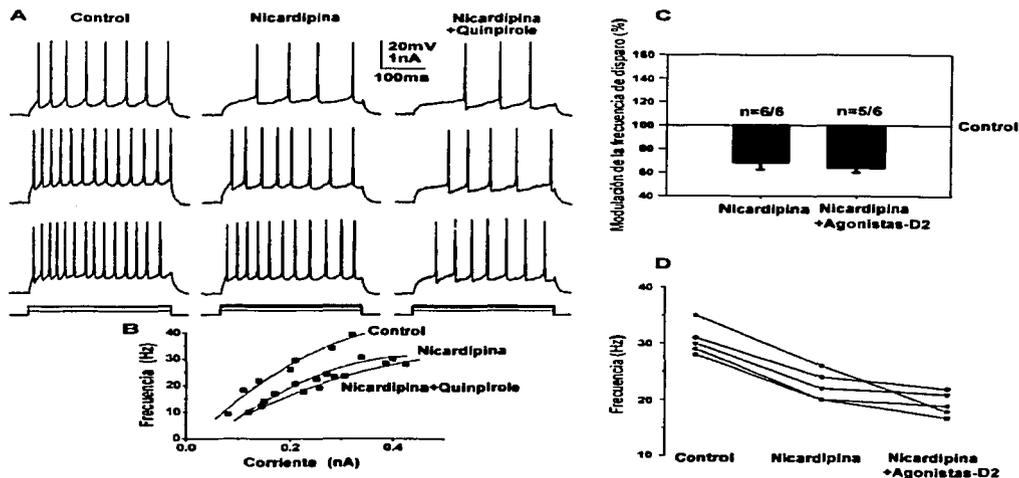


Figura 10. La nicardipina bloquea la acción los agonistas D2. A, registros obtenidos de una NEM. Se muestran tres trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de tres pulsos de corriente de diferente intensidad, en situación control (columna izquierda), en presencia de nicardipina (2.5 μ M; columna central) y finalmente con nicardipina y quinpirole (5-10 μ M; columna derecha). B, curva I-F de la célula mostrada en A. La nicardipina disminuyó la frecuencia de disparo. Este efecto se refleja como un desplazamiento de la curva hacia la derecha. El quinpirole aplicado en presencia constante de nicardipina, no tuvo un efecto adicional considerable en la curva I-F. C, la nicardipina redujo en un 32 ± 5 % el valor de la frecuencia media de disparo de la curva I-F. Los agonistas D2 añadidos a cinco de estas células, no provocaron ninguna respuesta significativa adicional. D, disminución de la nicardipina y bloqueo de la respuesta D2, en la frecuencia media de la curva I-F de cada una de las cinco células estudiadas.

Esta hipótesis fue comprobada mediante la adición secuencial de la dihidropiridina nicardipina y los agonistas D2 (ver figura 10). Como se menciona en el artículo, el bloqueo específico de las conductancias de calcio tipo L redujo significativamente en un $32 \pm 5 \%$ el valor de la frecuencia media de la curva Intensidad-Frecuencia ($p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; figura 10 C). La adición posterior de los agonistas D2 en cinco de estas células (figura 10 D) no tuvo un efecto adicional significativo en la frecuencia de disparo, permaneciendo el porcentaje de reducción en un $36 \pm 3.5 \%$ ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon; figura 10 C).

Es importante mencionar que las curvas I-F obtenidas a partir de los registros en presencia de los agonistas D2 conservaron en todo momento las mismas características en forma a las obtenidas con la nicardipina. Es decir, los valores de las frecuencias mínimas y máximas observadas en las curvas I-F, así como la intensidad de la corriente inyectada para lograr cada uno, permanecieron constantes y sin cambios significativos a los establecidos por el bloqueo específico de las conductancias de calcio tipo L ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon):

- frecuencia mínima observada: con nicardipina, 16.5 ± 1.7 Hz; con nicardipina + agonistas-D2, 15 ± 3 Hz.
- corriente necesaria para provocar la frecuencia mínima: con nicardipina, 0.38 ± 0.13 nA; con nicardipina + agonistas-D2, 0.40 ± 0.10 nA.
- frecuencia máxima observada: con nicardipina, 24 ± 3 Hz; con nicardipina + agonistas-D2, 22 ± 5 Hz.

En cuatro de las neuronas registradas con este protocolo, los agonistas D2 cambiaron notoriamente la forma del PPH que sigue a los potenciales de acción durante el tren de disparo (ver figura 10 A, trazos de la columna derecha). Si bien este efecto fue observado en otras células sin previo bloqueo de las conductancias de calcio tipo L (por ejemplo ver figura 13 en el tercer apartado de resultados), el hecho de que en presencia de nicardipina fuera también observado, sugiere que estos receptores podrían estar modulando conjuntamente conductancias de calcio no L, presumiblemente N y P/Q, mismas que como se describe en el artículo y en un trabajo previo del laboratorio (Vilchis et al., 2000),

regulan de modo importante el PPH. Sin embargo, en ningún momento esta modulación fue capaz de compensar o revertir la disminución en la frecuencia de disparo, sugiriendo nuevamente que el efecto predominante de los receptores D2 en la excitabilidad de la NEM, se da a nivel de las mesetas despolarizantes mediadas por las conductancias de calcio tipo L y no en el PPH. Respaldao este hecho, trabajos realizados en nuestro laboratorio en NEMs disociadas han demostrado que los agonistas D2 disminuyen las corrientes aisladas de calcio tipo P/Q pero no las N (Salgado et al., 2002) y como se examinó en el artículo, es necesario el bloqueo conjunto de ambas para lograr un aumento significativo en la pendiente de la curva I-F.

Por otro lado, estos cuatro casos en donde se observó la modulación del PPH en presencia de nicardipina pueden ser considerados como evidencia de que se trataban de neuronas responsivas a los agonistas D2.

Los receptores D2 podrían ejercer su acción principal, reduciendo las conductancias de calcio tipo L a nivel somato-dendrítico.

Como se mostró en el artículo anexo en el primer apartado de resultados de esta tesis, el agonista quinpirole revirtió el aumento de las mesetas despolarizantes inducidas directamente por la aplicación del agonista específico de los canales de calcio tipo L, BAY-K 8644 (2.5 - 5 μ M).

En dos células en donde se añadió el BAY-K 8644, el pulso de corriente inyectado provocó la generación de un potencial de acción cuya fase de repolarización fue constantemente interrumpida por la aparición de eventos regenerativos todo o nada, que por su umbral (\approx -30 mV) y su forma, podrían atribuirse a potenciales de calcio presumiblemente de origen dendrítico (ver figura 11; Bargas et al., 1991; Schiller et al., 1997). Estos potenciales se observaron con una latencia de aproximadamente 8 milisegundos después de iniciado el potencial de acción somático, reflejando quizás la dinámica de propagación retrógrada del potencial hacia las porciones distales de la dendrita (Stuart y Sakmann, 1994).

La aplicación de quinpirole (10 μM) redujo inicialmente (a los 10 minutos aproximadamente) la amplitud máxima del potencial tardío en un 25 %. Después de 15 minutos de haber sido añadido el agonista, la frecuencia de aparición de dicho evento disminuyó hasta desaparecer por completo a los 20 minutos, quedando solamente el potencial de acción somático con una fase repolarizante lentificada.

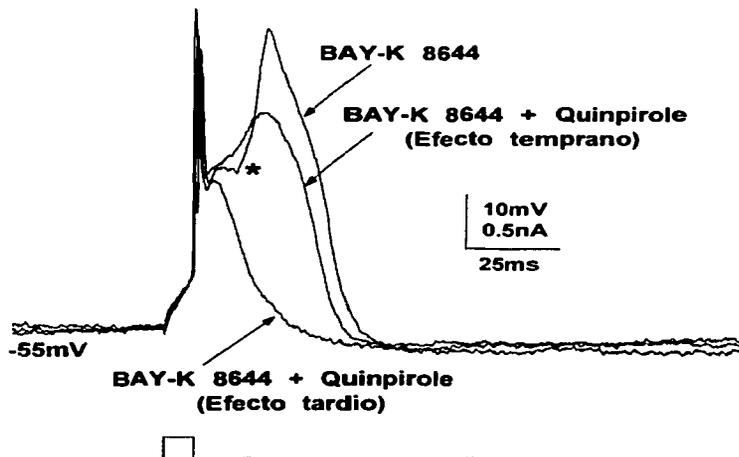


FIGURA 11. Los receptores D2 podrían ejercer su acción principal reduciendo las conductancias de calcio tipo L a nivel somato-dendrítico. La presencia de BAY-K 8644 (5 μM) provocó la aparición de eventos regenerativos presumiblemente de origen dendrítico debido a su forma y a su elevado umbral de generación (≈ -30 mV; marcado con asterisco). Esta actividad fue gradualmente disminuida en amplitud por la aplicación de quinpirole (5-10 μM) hasta desaparecer completamente.

Si bien hace falta tener mediciones más precisas de la actividad electrofisiológica de las dendritas o de la entrada de calcio en ellas, estos resultados sugieren que los receptores D2 podrían ejercer su acción reduciendo las conductancias de calcio tipo L presentes a ese nivel de la neurona (Caterall, 1998).

Conclusiones.

El calcio que ingresa a la NEM a través de sus diferentes canales es procesado de manera diferencial, regulando diferentes aspectos de la actividad eléctrica celular:

- El bloqueo selectivo de las conductancias de calcio tipo L disminuye la excitabilidad de la NEM mimetizando y ocluyendo el efecto de los agonistas D2.

- Los agonistas D2, al igual que los antagonistas de las conductancias de calcio tipo L, actúan principalmente disminuyendo el componente de despolarización adicional que se suma a la despolarización provocada por el pulso de corriente. En consecuencia, ambos fármacos disminuyen el rango dinámico de actividad de la NEM.

- La acción principal de los receptores D2 sobre las conductancias de calcio tipo L podría tener lugar a nivel somato-dendrítico.

- El bloqueo selectivo de las conductancias de calcio tipo no-L aumenta la excitabilidad de la NEM disminuyendo la amplitud del PPH.

- La activación de los receptores D2 cambió la forma del PPH que sigue a los potenciales de acción en un tren de disparo. Este efecto es observado aún en presencia de la nicardipina, lo que sugiere que estos receptores modulan las conductancias de calcio tipo no-L. Sin embargo este efecto no repercutió significativamente en la frecuencia de disparo.

APARTADO 3.

Interacción funcional entre los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en la neurona espinosa mediana.

Los resultados presentados hasta ahora demuestran que la activación de los receptores D2 disminuye principalmente eventos mediados por conductancias de calcio tipo L, demostrando así un claro antagonismo con los efectos previamente descritos para los receptores dopaminérgicos D1 (Surmeier et al., 1995a y b; Hernández-López et al., 1997).

A continuación se presenta evidencia del impacto fisiológico de activar de manera secuencial ambas familias de receptores en una misma NEM.

La activación de los receptores D2 revierte el aumento en la generación de las mesetas despolarizantes inducidas por activación de los receptores D1.

A potenciales de membrana subumbrales (-50 mV) la inyección intracelular de un breve pulso de corriente (≈ 20 milisegundos de duración) generó mesetas despolarizantes que sobrepasaron la duración del estímulo (figura 12). La aplicación del agonista de la familia D1 SKF-81297 al medio extracelular aumentó la probabilidad de aparición, la duración y la amplitud de estos eventos ($n = 5/5$; $p < 0.05$ prueba de Wilcoxon).

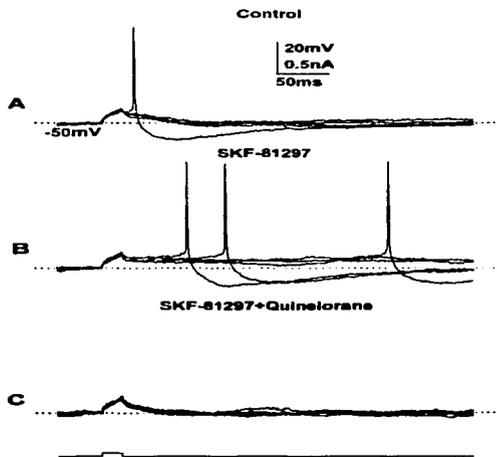


Figura 12. La activación de los receptores D2 abolió la generación de las mesetas despolarizantes facilitadas por los receptores D1. A, la inyección de pequeños pulsos de corriente (mostrado en la parte inferior) a potenciales de membrana subumbrales (-50 mV) evocaron despolarizaciones sostenidas que sobrepasan la duración del estímulo (20 ms). B, el agonista SKF-81297 (1-5 μ M) aumentó la probabilidad de aparición y prolongó la duración de las mesetas, facilitando la generación de potenciales de acción. C, quinelorane (1-5 μ M) añadido en presencia del agonista de la familia D1, revirtió el efecto despolarizante. En cada condición se muestran cinco trazos de voltaje superpuestos, registrados consecutivamente.

La activación de los receptores D1, y la consecuente facilitación de las despolarizaciones sostenidas, favoreció la generación de potenciales de acción inclusive varios cientos de milisegundos después de haber terminado el estímulo de corriente inyectado. La aplicación posterior de los agonistas D2 en presencia de SKF-81297 abolió notoriamente las despolarizaciones en las cinco neuronas estudiadas ($p < 0.05$, prueba de Wilcoxon).

La activación de los receptores D2 revierte el aumento de la frecuencia de disparo provocado por el agonista D1, SKF-81297.

El agonista dopaminérgico tipo D1, SKF-81297, incrementó en un 32 ± 4.2 % la frecuencia de disparo media de la curva I-F (ver figura 13). El efecto se observó en el 100 % de las células estudiadas ($n = 7$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). Estos resultados corroboran nuevamente el efecto excitador de los receptores D1 debido a la facilitación de las mesetas despolarizantes ya descritas (Hernández-López et al., 1997).

La aplicación posterior de los agonistas D2 en presencia constante del agonista D1 revirtió el aumento en la excitabilidad de las NEMs situando el valor de la frecuencia media de la curva I-F, en un 7 ± 6 % por debajo del valor control (figura 13 D; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). Control: 31.3 ± 1.2 Hz; SKF-81297: 41.3 ± 1.8 Hz; SKF-81297 + agonistas D2: 29.2 ± 2 Hz.

Al igual que como se mostró en la figura 10 del segundo apartado de resultados, el quinpirole nuevamente cambió la forma de los PPHs durante los trenes de potenciales de acción registrados en presencia de quinpirole (ver figura 13 A, registros de la columna derecha).

Los efectos de los agonistas D2 fueron evidentes en el 85 % de las células estudiadas ($n = 6/7$; figura 13 D). En la célula en donde el agonista D2 no provocó ningún tipo de respuesta, la curva I-F permaneció constante por más de 50 minutos en los valores establecidos por el agonista SKF-81297. Por otro lado, los experimentos en donde la acción de los receptores D2 fue observada, fueron realizados en su totalidad en no más de 30

minutos. Estos hechos nos permiten descartar que la disminución en la excitabilidad de la NEM observada durante la administración de los agonistas D2, sea atribuida a la

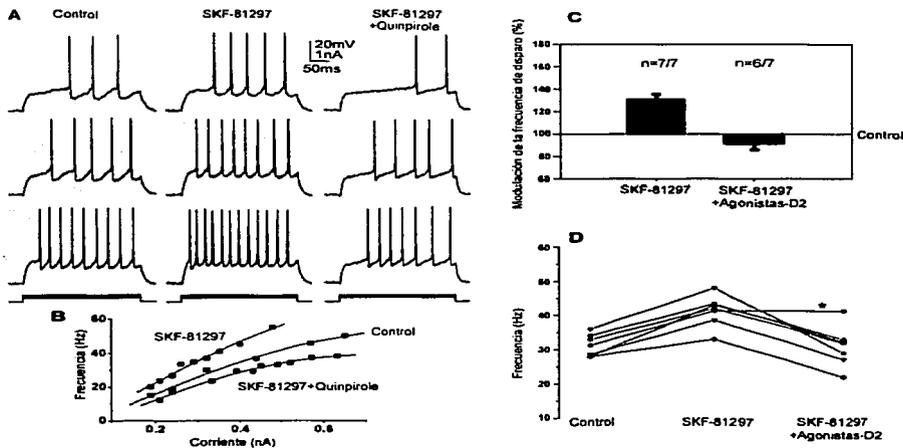


Figura 13. La activación de los receptores D2 revierte el aumento en la frecuencia de disparo provocado por los receptores D1. A, registros obtenidos de una NEM. Se muestran tres trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de tres pulsos de corriente de diferente intensidad, en situación control (columna izquierda), en presencia del agonista D1 SKF-81297 (1-5 μ M; columna central) y finalmente con SKF-81297 y quinpirole (5-10 μ M; columna derecha). B, curva I-F de la célula mostrada en A. El agonista SKF-81297 aumentó la frecuencia de disparo, este efecto se refleja como un desplazamiento de la curva hacia la izquierda. El quinpirole aplicado en presencia constante de SKF-81297, revirtió el efecto excitador de los receptores D1 desplazando la curva I-F inclusive por valores debajo de la curva control. C, el SKF-81297 incrementó en un 40 ± 10 % el valor de la frecuencia media de disparo de la curva I-F. Los agonistas D2, redujeron la acción de los receptores D1 situando la frecuencia media de la curva I-F en 5 ± 17 % por debajo del valor control. La acción de los agonistas D2 se observó en el 85 % de las células estudiadas (n = 6/7). D, Se muestra para cada célula estudiada, el aumento y disminución en la frecuencia media de la curva I-F, provocados por los agonistas D1 y D2 respectivamente. El asterisco indica la NEM en donde el agonista D2 no revirtió el efecto del SKF-81297.

internalización o desensibilización de los receptores D1 (Kabbani et al., 2002) y no a la acción de los receptores D2.

Los receptores D2 revierten el aumento en la duración del potencial de calcio provocado por los agonistas SKF-81297 y BAY-K 8644.

De acuerdo a estudios previos (Hernández-López et al., 1997), el aumento en las conductancias de calcio tipo L, ya sea por la activación de los receptores D1 (figura 14 A) ó bien directamente por el agonista BAY-K 8644 (figura 14 B), promovieron un aumento en la duración del potencial de calcio inducido por TEA 20 mM, en un $30 \pm 5 \%$ ($n = 3/3$) y en un $50 \pm 10 \%$ respectivamente ($n = 2/2$). En ambos casos el quinpirole fue capaz de revertir estos efectos. El agonista D2 disminuyó el potencial de calcio aumentado por el SKF-81297, quedando en un $36 \pm 7 \%$ por debajo de la condición control; mientras que el aumento registrado en presencia de nicardipina fue revertido parcialmente en un $30 \pm 10 \%$. La acción del quinpirole se observó en todas las NEMs estudiadas en cada condición farmacológica.

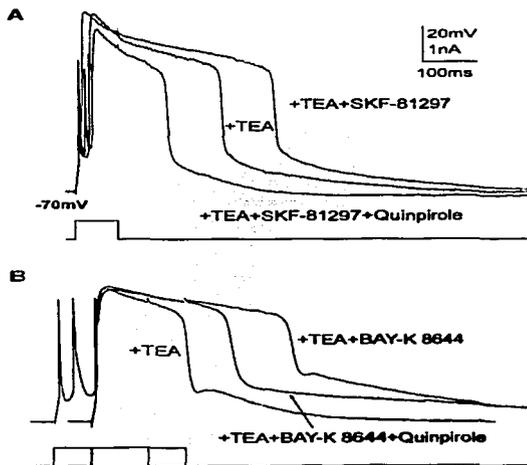


Figura 14. La activación de los receptores D2 revierte el aumento en la duración del potencial de calcio provocado por los agonistas SKF-81297 (1-5 μM) y BAY-K 8644 (2.5 μM). Se muestran para dos neuronas, los registros sobrepuestos de tres potenciales de calcio inducidos por TEA (20 mM) y provocados por la inyección intracelular de un pulso de corriente despolarizante (parte inferior de cada panel). A, SKF-81297 incrementó en un $30 \pm 5 \%$ ($n = 3/3$) la duración del potencial. La aplicación posterior de quinpirole (5-10 μM) en presencia continua del agonista D1, revirtió el efecto de éste último quedando en un $36 \pm 7 \%$ por debajo de la condición control. B, BAY-K 8644 aumentó en un $50 \pm 10 \%$ ($n = 2/2$) la duración del potencial. El quinpirole revirtió en un $30 \pm 10 \%$ el efecto del agonista BAY-K 8644.

Los receptores D2 revierten el aumento en la amplitud del PPH provocado por el agonista SKF-81297.

La capacidad de los agonistas D2 de revertir la acción de los receptores D1 también se observó en el PPH que sigue a un potencial de acción (figura 15). En concordancia con lo previamente descrito por nuestro laboratorio (Hernández-López et al., 1996), la activación de los receptores D1 aumentó significativamente la amplitud de los PPH en un $25 \pm 2 \%$ ($n = 5/5$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). La adición del agonista quinolorane en presencia del SKF-81297 revirtió el efecto de este último, quedando el $74 \pm 5 \%$ de la respuesta control ($n = 5/5$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). Control: 8.3 ± 0.3 mV; SKF-81297: 10.4 ± 0.5 mV; SKF-81297 + quinolorane: 6.2 ± 0.5 mV.

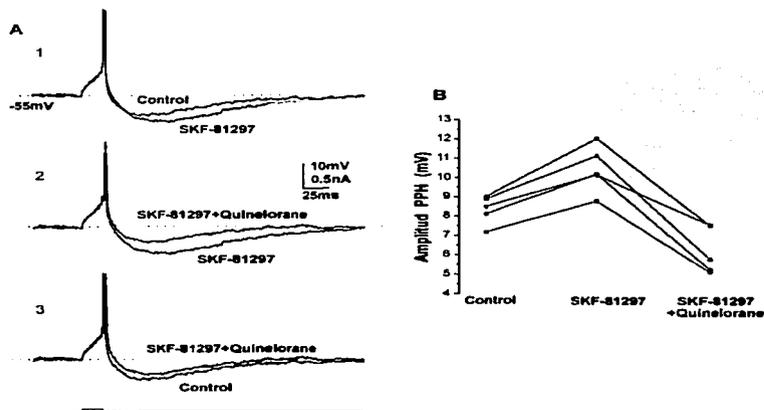


Figura 15. La activación de los receptores D2 revierte el aumento en la amplitud del PPH provocado por el agonista D1. A, registros ampliados y superpuestos de los PPHs que siguen a potenciales de acción (truncados), obtenidos por la inyección de un breve pulso de corriente (≈ 20 milisegundos). Se comparan los registros: 1- control y en presencia de SKF-81297 ($1-5 \mu\text{M}$); 2- en presencia única de SKF-81297 y junto con el agonista quinolorane ($5 \mu\text{M}$); 3- control y en presencia de ambos fármacos. B, se muestra para cada célula estudiada ($n = 5$), la variación en la amplitud del PPH (en valores absolutos de voltaje) por la aplicación secuencial de los agonistas D1 y D2.

Los agonistas D2 fueron capaces de revertir la acción de los receptores D1 en cada uno de los protocolos descritos hasta ahora. Sin embargo como se verá a continuación, el cambio en el orden de administración de los fármacos reveló un nuevo aspecto de la modulación de los receptores dopaminérgicos.

La administración del agonista SKF-81297 fue incapaz de revertir la disminución en la generación de mesetas despolarizantes por la activación previa de los receptores D2.

La generación de mesetas despolarizantes espontáneas fue drásticamente reducida por la activación de los receptores D2 ($n = 5/5$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; figura 16). La aplicación posterior del agonista SKF-81297 en presencia ($n = 3$) y ausencia ($n = 2$) del quinolorane no recuperó la aparición de las mesetas ($n = 5/5$; $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon).

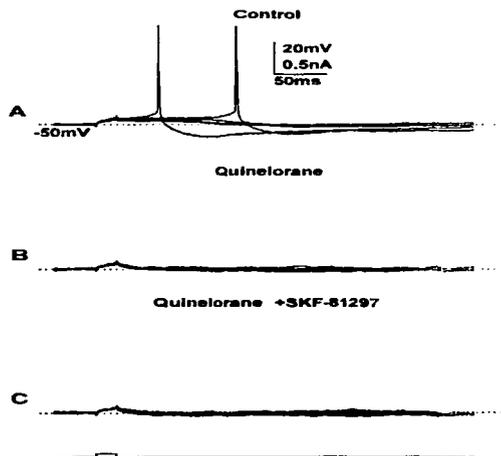


Figura 16. La aplicación del agonista D1 fue incapaz de revertir la disminución en la generación de las mesetas despolarizantes, provocada por la acción de los receptores D2. A, la inyección de pequeños pulsos de corriente (mostrada en la parte inferior) a potenciales de membrana subumbrales (-50 mV), evocaron despolarizaciones sostenidas que sobrepasan la duración del estímulo (20 ms). B, el agonista quinolorane (5-10 μM) disminuyó la probabilidad de aparición de las mesetas. C, El agonista SKF-81297 (1-5 μM) añadido en presencia de quinolorane fue incapaz de revertir la acción de los receptores D2. En cada condición se muestran cinco trazos de voltaje superpuestos, registrados consecutivamente.

El agonista SKF-81297 no revirtió la disminución en la frecuencia de disparo ocasionada por activación de los receptores D2.

Como se mencionó en el primer apartado de resultados, la activación de los receptores D2 disminuyó en un $39 \pm 6\%$ la frecuencia del disparo repetitivo de la NEM. Este efecto se reprodujo en el 82% de las células estudiadas ($n = 14/17$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; figura 17). La aplicación de SKF-81297 en seis células con respuesta positiva a

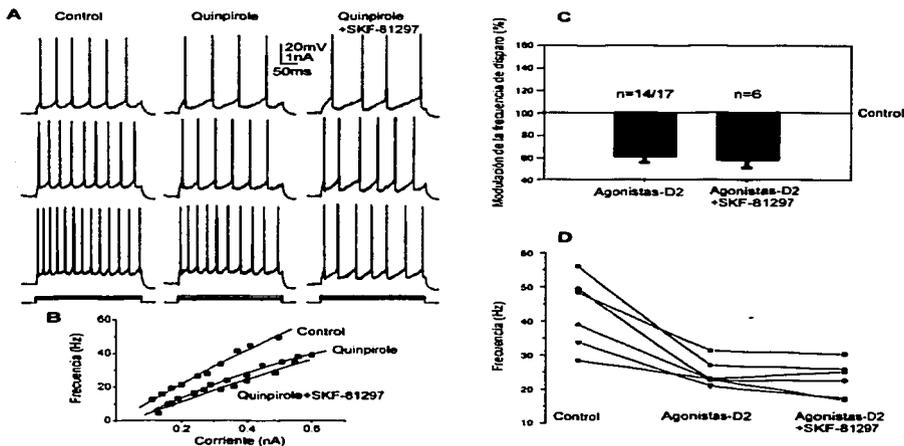


Figura 17. El agonista D1 no revirtió la disminución en la frecuencia de disparo provocada por los receptores D2. A, registros obtenidos de una NEM. Se muestran tres trenes de potenciales de acción provocados por la inyección de tres pulsos de corriente de diferente intensidad, en situación control (columna izquierda), en presencia del agonista D2 quinpirole (5-10 μM ; columna central) y finalmente con quinpirole y SKF-81297 (1-5 μM ; columna derecha). B, curva I-F de la célula mostrada en A. El agonista D2 disminuyó la frecuencia de disparo, este efecto se refleja como un desplazamiento de la curva I-F hacia la derecha. El SKF-81297 aplicado posteriormente y en presencia constante de quinpirole, no provocó ningún cambio adicional en la curva I-F. C, los agonistas D2 disminuyeron en un $39 \pm 6\%$ el valor de la frecuencia media de disparo de la curva I-F ($n = 14/17$). La aplicación de SKF-81297 en seis células con respuesta positiva a los agonistas D2, no revirtió la respuesta de los receptores D2 ($n = 6/6$). D, Para cada célula estudiada se muestran los valores de la frecuencia media de la curva I-F, establecidos por los agonistas D2 y el D1.

los agonistas D2 no revirtió la respuesta de los receptores D2 ($n = 6/6$), quedando una reducción total del $43 \pm 7\%$ ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon). Control: 42.5 ± 4.3 Hz; agonistas D2: 25.3 ± 1.4 Hz; agonistas D2 + SKF-81297: 24 ± 2 Hz.

La reducción en la duración del potencial de calcio por la activación de los receptores D2 es irreversible por el agonista D1.

Como se describió en el primer apartado de resultados (ver figura 7 B del artículo anexo), la activación de los receptores D2 redujo en un 25 % la duración de los potenciales de calcio inducidos por TEA (figura 18, $n = 5/5$; $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon). El agonista D1 añadido a tres de estas células, no provocó ninguna acción adicional por más de 30 minutos (figura 18 B).

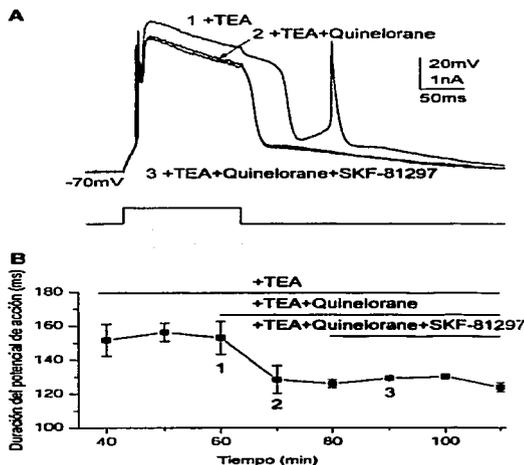


Figura 18. El agonista D1 no revirtió la reducción en la duración del potencial de calcio, ocasionada por la activación de los receptores D2. A, registros superpuestos de potenciales de calcio inducidos por TEA (20 mM). El agonista quinelorane (5 μ M), disminuyó la duración del evento en un 25 % ($n = 5/5$). La acción de los receptores D2 no se alteró por la aplicación posterior de SKF-81297 (5 μ M). Los registros fueron obtenidos inyectando pulsos de corriente despolarizante a una frecuencia baja, (0.1 Hz) intercalados con pulsos hiperpolarizantes para prevenir cambios ocasionados por la inactivación de las corrientes. Los trazos mostrados fueron seleccionados de cada uno de los tiempos enumerados en B. B, curso temporal del experimento.

El agonista D1 no revierte la modulación del PPH por el quinolorane.

La asimetría funcional descrita hasta ahora entre ambas familias de receptores tiene también lugar a nivel del PPH. En este caso, el agonista SKF-81297 no revirtió la reducción en la amplitud de los PPHs establecida por la activación previa de los receptores D2 ($n = 5/5$; $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon; figura 19). Control: 8.3 ± 0.6 mV; quinolorane: 5.5 ± 0.4 mV; quinolorane + SKF-81297: 5.4 ± 0.3 mV. En dos de estas células, la aplicación del agonista D2 fue suspendida al momento de que se añadió el agonista D1.

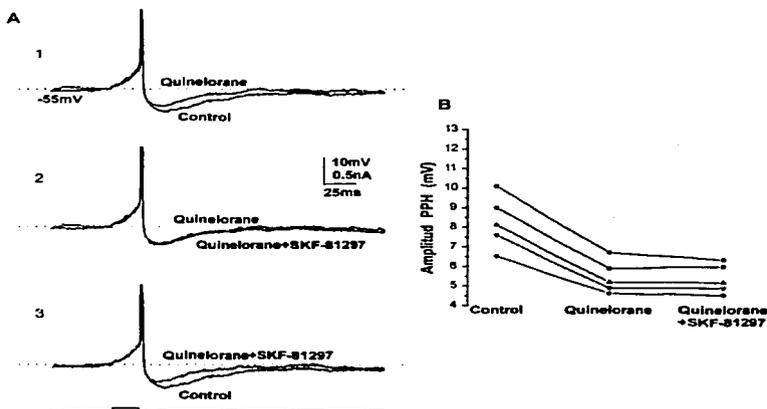


Figura 19. El agonista D1 no revirtió la reducción en la amplitud del PPH ocasionada por la activación de los receptores D2. A, registros ampliados y superpuestos de los PPHs que siguen a potenciales de acción (truncados), obtenidos por la inyección de un breve pulso de corriente (≈ 20 milisegundos). Se comparan los registros: 1- control y en presencia de quinolorane ($5-10 \mu\text{M}$); 2- en presencia única de quinolorane y junto con el agonista SKF-81297 ($1-5 \mu\text{M}$); 3- control y en presencia de ambos fármacos. B, se muestra para cada célula estudiada ($n = 5$), la variación en la amplitud del PPH (en valores absolutos de voltaje) por la aplicación secuencial de los agonistas D2 y D1.

Conclusiones.

- El 100 % de las neuronas en las que primero se añadió el agonista D1 (SKF-81297), tuvo alguna de las respuestas electrofisiológicas características de esta familia de receptores; por otro lado, el 85 % de las neuronas en las que se aplicó alguno de los agonistas D2, ya sea con o sin la presencia previa del agonista D1, respondió electrofisiológicamente. Sólo un alto nivel de coexpresión de receptores funcionales de ambas familias puede explicar estos resultados.

- La activación de los receptores D2 revirtió la respuesta de los receptores D1 previamente establecida. Sin embargo, el agonista D1 nunca revirtió la acción previa de los receptores D2. Por lo tanto, estos experimentos evidencian una asimetría funcional entre ambas familias de receptores dopaminérgicos.

6. DISCUSIÓN.

6.1 Efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo D2 sobre el patrón de disparo de la neurona espinosa mediana.

Los resultados descritos en esta tesis demuestran el papel inhibitor que juegan los receptores dopaminérgicos D2 en el patrón temporal de disparo de la NEM. Este efecto modulador tiene lugar a potenciales de membrana relativamente despolarizados (> -60 mV) que simulan el denominado “up-state” registrado en preparaciones *in vivo* (Wilson y Groves, 1981; Wilson, 1993; Wilson y Kawaguchi, 1996). A diferencia de los receptores D1, la activación de los receptores dopaminérgicos D2 no provoca ninguna respuesta moduladora en la rectificación anómala de la célula, que se presenta a potenciales de membrana más hiperpolarizados (< -80 mV; Pacheco-Cano et al., 1996). Por lo tanto, el rango de acción de los receptores D2 en la regulación del disparo de la NEM se restringiría a potenciales de membrana despolarizados, muy probablemente durante el “up-state”.

El efecto inhibitor de los receptores D2 sobre el patrón de disparo de la NEM fue reproducido sistemáticamente en un amplio porcentaje de neuronas (el 81 %; $n = 60/74$). Cabe destacar que en ningún caso la acción de estos receptores tuvo una respuesta excitadora. Este hecho contrasta con otros estudios previos en donde se atribuyó a los receptores D2 un papel excitador en el disparo de la NEM (ver por ejemplo Herrling y Hull, 1980; Uchimura et al. 1986; Akaike et al., 1987). Estas diferencias pueden deberse básicamente al tipo de metodología empleada, ya que en varios de estos trabajos para lograr la activación diferencial de los receptores D1 y D2, se utilizaron diferentes concentraciones de DA basándose en la selectividad de esta catecolamina por cada receptor (ver por ejemplo Akaike et al., 1987). Esta manipulación tiene el inconveniente de que la DA es altamente oxidable, además de que es recapturada rápidamente por los transportadores de este neuromodulador. Por el contrario, en los experimentos descritos en esta tesis se utilizaron fármacos más selectivos para cada familia de receptores que, a diferencia de la DA, no son degradados tan fácilmente.

Por otro lado, en los estudios previos se realizaron registros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de corriente, sin un control riguroso del potencial de membrana de las células, que como ya ha sido revisado en la parte introductoria de esta tesis, constituye una variable determinante en la acción moduladora de los receptores dopaminérgicos como es el caso de la familia D1 (Hernández-López et al., 1997). En los experimentos descritos en esta tesis, se tuvo especial cuidado en mantener de manera constante el mismo potencial de membrana, corrigiendo cualquier variación en el mismo mediante la inyección de corriente directa.

Por último, a diferencia de los trabajos ya mencionados, en los presentes resultados se evaluó el efecto modulador de los receptores D2 en diferentes eventos determinantes del disparo celular, como son las mesetas despolarizantes y el PPH, cuya naturaleza iónica ha sido estudiada en detalle (Hernández-López et al., 1997; Vilchis et al., 2000; Pérez-Garci et al., 2003).

El efecto inhibitor de los receptores dopaminérgicos tipo D2 sobre la excitabilidad de la NEM se suma a la inhibición de la respuesta postsináptica excitadora en la NEM, mediada por los receptores glutamatérgicos tipo AMPA (Cepeda et al., 1993, Levine et al., 1996; Cepeda y Levine, 1998; Hernández-Echeagaray y Levine, 2002); así como al efecto inhibitor que ejerce sobre la NEM para inhibir presinápticamente la liberación de GABA en el GPe (Florán et al., 1997; Cooper y Stanford, 2001) y dentro del NE sobre otras NEMs (Guzmán et al., 2002). Actualmente no se cuentan con agonistas selectivos para cada subtipo de la familia D2 (D2, D3 y D4), sin embargo sería interesante determinar si cada uno éstos regula procesos celulares de manera diferencial.

6.2 Acciones opuestas de los receptores D1 y D2 en el disparo de la neurona espinosa mediana.

Los efectos observados por la activación de los receptores D2 son opuestos a la respuesta excitadora de los receptores D1 registrada cuando el potencial de membrana de la NEM se encuentra despolarizado (Hernández-López et al., 1997). Las acciones contrarias

de las dos familias de receptores han sido recientemente corroboradas en NEMs registradas intracelularmente en preparaciones *in vivo* (West y Grace, 2002). En este trabajo, la actividad de las dos familias de receptores dopaminérgicos fue aislada perfundiendo antagonistas selectivos para cada una de las dos familias, a través de una cánula de microdiálisis colocada cerca del área de registro. La acción de la DA endógena sobre cada una de las familias no bloqueada por los antagonistas reprodujo los efectos descritos previamente para los receptores D1 (Hernández-López et al., 1997) así como para los D2 (Hernández-López et al., 2000).

De manera muy interesante las respuestas excitadoras de los receptores dopaminérgicos tipo D1, así como las inhibitorias de los D2, han sido reproducidas en neuronas espinosas localizadas en el área X y el lóbulo parolfatorio de diferentes aves (Ding y Perkel, 2002). Estas estructuras guardan un alto grado de semejanza con los ganglios basales de los mamíferos por su organización topográfica, conectividad sináptica, citoarquitectura y neuroquímica (ver Perkel y Farries, 2000; Ding y Perkel 2002). La similitud de las acciones mediadas por cada una de las familias de receptores dopaminérgicos en el ave, con las previamente descritas en la rata (Hernández-López et al., 1997 y 2000), sugiere que las funciones fisiológicas del sistema dopaminérgico se encuentran altamente conservadas en los amniotas (Ding y Perkel 2002).

6.3 Antagonismo dopaminérgico en la modulación de las conductancias de calcio tipo L.

Las conductancias de calcio tipo L constituyen el principal blanco de acción para el antagonismo dopaminérgico observado en la modulación del disparo repetitivo de la NEM; la familia de receptores D1 promueve un aumento en las corrientes de calcio tipo L (Surmeier et al., 1995a,b), mientras que la activación de los receptores D2 las inhiben (Hernández-López et al., 2000). De manera interesante, las vías de señalización intracelular asociadas a cada familia son diferentes, enriqueciendo así las posibles implicaciones funcionales de activar cada una.

La capacidad de los receptores D2 de promover la liberación de calcio de pozas intracelulares, reducir las corrientes de calcio tipo L, y suprimir la actividad regenerativa de la NEM, reconcilia parte de la discrepancia reportada previamente por estudios de carácter bioquímico. Por un lado, el incremento en los niveles de calcio intracelular provocado por la activación de los receptores D2 explicaría el aumento de la actividad de la fosfatasa calcineurina (Nishi et al., 1997) y de la proteína cinasa activada por mitógenos dependiente de calcio (Yan et al., 1999). Estos eventos han sido interpretados como evidencia del aumento en la actividad celular por activación de los receptores D2. Por otro lado, el bloqueo de los receptores D2 así como una disminución en el tono dopaminérgico del NE, provoca un aumento en la transcripción de genes de expresión temprana, así como de la enzima ácido-glutámico descarboxilasa y el neuropéptido encefalina (Gerfen et al., 1990; Chesselet et al., 1998). Las corrientes de calcio tipo L se encuentran involucradas en la actividad de diferentes reguladores transcripcionales en varios tipos neuronales (Bading et al., 1993; Graef et al., 1999), incluidas las neuronas del NE (Rajadhyaksha et al., 1999). El bloqueo de los receptores D2, así como una disminución en su actividad debida a una baja en el tono dopaminérgico, cesaría la supresión de las corrientes de calcio tipo L induciendo un aumento en la expresión de diferentes genes. Esto ha sido interpretado como una evidencia bioquímica del papel inhibitor de esta familia de receptores.

El impacto de bloquear selectivamente las conductancias de calcio tipo L sobre el disparo repetitivo de la NEM fue analizado y comparado con el efecto de bloquear las conductancias N y P/Q (Pérez-Garci et al., 2003). Estas manipulaciones resultaron en efectos opuestos en la excitabilidad de la NEM. El bloqueo de las conductancias de calcio N y P/Q, las cuales se han reportado que activan las corrientes de potasio sensibles a calcio (Vilchis et al., 2000), resultó en un aumento en la excitabilidad de las neuronas provocado por la disminución en la amplitud del PPH. Por otro lado, el bloqueo farmacológico de los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$, que median las corrientes de calcio tipo L en las NEMs, disminuyó la frecuencia de disparo de la célula mimetizando y ocluyendo el efecto de los agonistas D2. Estos resultados demuestran que la acción principal de los receptores D2 para regular la excitabilidad en estas neuronas se da a nivel de las mesetas despolarizantes sostenidas.

Es interesante comparar la acción de los receptores D2 con la modulación ejercida por los receptores muscarínicos tipo M1, los cuales al ser activados cuando la célula está a potenciales de membrana despolarizados, aumentan la excitabilidad de la NEM reduciendo notoriamente la amplitud del PPH en más de un 50 % a través de una vía mediada por la proteína cinasa C (Pineda et al., 1995). El efecto excitador promovido por los receptores M1 tiene lugar a pesar de que se ha demostrado que su activación promueve también una disminución en las corrientes de calcio tipo L (Surmeier, 2000). Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que la activación de estos receptores colinérgicos disminuyen también las corrientes N y P/Q conjuntamente (Pérez-Roselló et al., 2002), que como se mencionó en los resultados de esta tesis (Pérez-Garci et al., 2003) es un requisito indispensable para reducir sustancialmente la amplitud del PPH y favorecer el disparo repetitivo. En contraste, la activación de los receptores D2 sólo disminuyen las corrientes P/Q pero no las N (Salgado et al., 2002). Como una posible consecuencia de este efecto parcial, la amplitud del PPH solo se redujo en un 28 %, que fue incapaz de revertir o compensar la reducción en la frecuencia de disparo provocada por la disminución en la generación de mesetas despolarizantes. En el caso de los receptores M1, la reducción tan notable en la amplitud del PPH sí podría ser suficiente para compensar su inhibición sobre las conductancias de calcio tipo L.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a las diferentes subunidades α_1 que conforman cada uno de los canales de calcio, se ha descrito una compartimentalización subcelular en su expresión en diferentes tipos neuronales (revisado en Catterall, 1998). Las subunidades α_{1C} y α_{1D} que caracterizan a los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$, respectivamente (Caterall, 2000), se encuentran expresadas preferentemente en el soma y en las dendritas de diferentes neuronas (revisado en Catterall, 1998). Este hecho concuerda con la observación de la actividad regenerativa presumiblemente de origen dendrítico, provocada por el agonista de los canales de calcio tipo L, BAY-K 8644. El agonista quinpirole inhibió la generación de estos potenciales, lo que sugiere que los receptores D2 podrían ejercer su acción principal en el patrón de disparo al reducir las conductancias de calcio tipo L presentes a nivel somato-dendrítico.

Por otro lado, las subunidades $\alpha 1_A$ y $\alpha 1_B$ que determinan la generación de corrientes P/Q y N, respectivamente, se encuentran densamente localizadas en las terminales presinápticas de varios tipos de neuronas (revisado en Catterall, 1998). De modo consistente con las posibles implicaciones de inhibir las corrientes de calcio tipo P/Q que estarían localizadas principalmente alrededor de los botones presinápticos de las NEM, se ha demostrado que la activación de los receptores D2 disminuye la liberación de GABA proveniente de las NEMs en el GPe (Florán et al., 1997; Cooper y Stanford, 2001), así como en las terminales de las colaterales recurrentes de estas neuronas y que inhiben a otras NEMs dentro del mismo NE (Guzmán et al., 2002).

Los resultados reportados en esta tesis sugieren que la acción de los receptores D2 en la regulación del disparo de la NEM es mediada principalmente por su modulación sobre las conductancias de calcio tipo L. El efecto modulador de dichos receptores sobre otras conductancias iónicas como el sodio y el potasio no es claro. Por ejemplo, si bien se ha descrito la presencia de canales de potasio activados exclusivamente por la activación de los receptores D2 (Freedman y Weight 1988; Greif et al., 1995), la naturaleza de dichos canales se desconoce. Por su nula dependencia a voltaje podría tratarse de canales que median corrientes de tipo “leak” o bien de canales sensibles a ATP, cuya activación podría ser mucho más relevante durante una condición de déficit metabólico celular reduciendo la excitabilidad de la NEM (Sun et al., 2001).

Por otro lado, el estudio de la modulación de las corrientes de sodio por la activación de los receptores D2 ha arrojado resultados contradictorios (Surmeier y Kitai 1993b). Mientras que en un porcentaje de NEMs, la activación de los receptores D2 inhibe las corrientes de sodio (en el 55 % de las células estudiadas), en otro las aumenta (el 20 % de las células estudiadas). Estos efectos hacen menos clara la participación de esta modulación en la regulación del disparo neuronal. Cabe mencionar que en los resultados presentados en esta tesis no se apreciaron cambios significativos en la amplitud máxima de los potenciales de acción ni en la pendiente ($\partial V/\partial t$) de su fase despolarizante.

6.4 Antagonismo D1-D2 en una misma neurona espínosa mediana.

El 100 % de las NEMs expuestas al agonista D1 respondió electrofisiológicamente al fármaco, mientras que el 81 % de las neuronas respondió a los agonistas D2. Estos resultados se sumarían al creciente número de evidencias anatómicas y fisiológicas que demuestra la expresión de miembros funcionales (D1, D2, D3, D4 y D5) de ambas familias de receptores en una misma NEM (Surmeier et al., 1993a y 1996; Aizman et al., 2000; David y Harrison, 2002). Esto contradice el modelo tradicional que plantea la segregación de éstas neuronas en dos grupos: uno que expresa receptores D1 y que conforma la vía directa; *versus* otro que expresa los receptores D2 y que da lugar a la formación de la vía indirecta (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1990). Sólo un 19 % de las neuronas no respondió a alguno de los agonistas D2. Este porcentaje concuerda con el reportado por Surmeier y colaboradores (1996) quienes describen la existencia de un 18 % de NEM con niveles detectables de sustancia P (pero no encefalina), que no coexpresa ninguna clase de receptor tipo D2, lo que sugiere que los casos de respuesta negativa a los agonistas D2 descritos en esta tesis, se pueden deber a neuronas que efectivamente no expresen estos receptores. Por otro lado, el agonista SKF-81287 activa indistintamente las isoformas D1 y D5 que pueden ser expresadas en casi la totalidad de las NEM (Surmeier et al., 1996).

Si el grado de colocalización de miembros funcionales de ambas familias de receptores es tan alto, ¿qué implicación funcional tiene el establecimiento de dos vías de salida del NE?. Una alternativa sería que una población de NEMs respondiera preferentemente a los agonistas D1 (la “vía directa”), mientras que en otra el efecto predominante sería el de los agonistas D2 (la “vía indirecta”). Sin embargo, esta posibilidad resulta improbable. Como se mostró en los resultados de esta tesis, los agonistas D2 siempre tuvieron una respuesta dominante sobre el efecto del agonista D1, ya sea revirtiéndolo o bloqueándolo una vez que el efecto D2 ha sido desarrollado.

Esta asimetría funcional debe tener su explicación en las cascadas de señalización involucradas por cada familia. En este sentido, es necesario recordar que las vías de señalización asociadas a cada familia son diferentes y que no se limitan a una relación

simple estimulación-inhibición de la enzima adenilato ciclasa. Sería necesaria la realización de experimentos *ad hoc* para poder determinar a qué nivel se establece este fenómeno.

La acción dominante de los receptores D2 sobre los D1 podría explicar el bloqueo de la potenciación de la respuesta NMDA, provocada por los receptores D1 (Flores-Hernández et al., 2002).

Si la acción de los receptores D2 es dominante sobre la ejercida por los receptores D1 ¿en qué momento la activación de estos últimos podría tener un efecto fisiológico relevante? Como se mencionó previamente, la DA posee una afinidad hasta 100 veces mayor por los receptores D2 que por los D1 ($K_i < 0.05 \mu\text{M}$ vs. $K_i \approx 0.5 - 5 \mu\text{M}$, respectivamente). La concentración homogénea basal de DA en el NE de la rata, estimada mediante estudios de microdialisis in vivo, es de 5-10 nM. La generación de ráfagas de disparo en aproximadamente el 75 % de la neuronas dopaminérgicas de la SNc ante la presentación de un estímulo reforzante puede elevar la concentración homogénea de DA a 500 nM e incluso alcanzar una concentración de 3 μM en el sitio inmediato de liberación (datos revisados en Schultz, 1998). En este momento la activación de los receptores D1 podría ser exitosa, debido quizás al número menor de pasos limitantes implicados en su vía de señalización, en comparación con el de las vías asociadas a los receptores D2. Así, los efectos excitadores asociados a los receptores D1 (generación de mesetas despolarizantes y facilitación de la respuesta NMDA) podrían desarrollarse, explicando con ello los periodos breves de actividad regenerativa fásica (≈ 500 milisegundos) registrados durante la realización de un movimiento.

6.5 Implicaciones fisiológicas de la modulación dopaminérgica vs. la colinérgica.

La correcta realización de un movimiento de algún miembro del cuerpo requiere la contracción de músculos agonistas, en paralelo con la relajación de músculos antagonicos. El NE constituye uno de los posibles sustratos neuronales implicados en esta inhibición recíproca. Esto ha sido demostrado por experimentos en los que el enfriamiento local del putamen resulta en la contracción simultánea de músculos recíprocamente inhibitorios. Por

otro lado, el mal de Parkinson se caracteriza por una rigidez muscular que igualmente se explica por un alto grado de contracción simultánea de músculos recíprocamente inhibitorios (revisado en Wickens y Oorschot, 2000).

Los diferentes modelos planteados como hipótesis para explicar el mecanismo neostriatal implicado en la correcta interacción de los músculos recíprocamente inhibitorios, tiene como base la inhibición lateral entre NEMs a través de sus colaterales recurrentes (Wickens y Oorschot, 2000; Oorschot, 2000, Plenz y Kitai, 2000). En este sentido, aquellos grupos de NEMs cuya excitabilidad se vea facilitada (por ejemplo, por la activación de las fibras corticales), inhibirán lateralmente a otros grupos de NEMs con las que establecen sinapsis y que no estén tan favorecidos. Básicamente estos modelos tratan de dar una explicación de cómo el NE es capaz de procesar el alto grado de convergencia de información cortical, favoreciendo la salida de información relevante para la contracción de unos músculos y la inhibición de otros, para poderse realizar correctamente el movimiento (Plenz y Kitai, 2000).

Por ejemplo, Wickens y Oorschot (2000) plantean en su modelo que la actividad de la interneurona colinérgica facilita simultáneamente la excitabilidad de múltiples NEMs en extensos dominios del NE, en donde su axón establece contactos sinápticos. Como resultado del incremento en la excitabilidad de éstas últimas, la proporción señal/ruido en el “output” del NE disminuiría, favoreciendo así la contracción simultánea de músculos opuestos, resultando en rigidez muscular. La estimulación dopaminérgica de las interneuronas colinérgicas provocaría su inhibición; este efecto estaría mediado principalmente por los receptores D2 y facilitaría la inhibición lateral (o “competencia”) entre NEMs, incrementando la proporción señal/ruido. La ausencia de dopamina, como sería el caso de la enfermedad de Parkinson, provocaría un aumento en la actividad de las interneuronas colinérgicas que excitarían simultáneamente varios grupos de NEMs favoreciendo así el síntoma de rigidez muscular.

Sin embargo, el papel fisiológico que juegan las colaterales recurrentes de los axones de las NEMs apenas empieza a ser entendido (Plenz y Kitai, 2000; Czubyko y Plenz, 2002).

Como se ha descrito en este trabajo, la acción de la DA sobre la NEM, a través de sus diferentes receptores, podría mediar de una forma más directa el procesamiento de la información cortical.

El efecto modulador de los receptores D1 sobre la rectificación anómala de las NEMs sugiere que las células serán menos responsivas a entradas corticales sinápticas débiles y desincronizadas. Sin embargo, si un grupo de neuronas recibe una entrada sináptica excitadora fuerte y sostenida, éstas serán seleccionadas y podrán transitar favorablemente hacia el estado despolarizado, en donde el efecto de los receptores D1 será reforzar la respuesta de disparo a través del establecimiento de las mesetas despolarizantes y la facilitación de la respuesta glutamatérgica tipo NMDA.

Recientemente se demostró que la activación de los receptores muscarínicos M1, al contrario de los receptores D1, median una disminución en la rectificación anómala de la célula, lo que aumenta considerablemente la resistencia de entrada. Como resultado de ésta modulación, la célula transita más fácilmente hacia regiones despolarizadas cercanas al umbral de disparo, favoreciendo así el disparo repetitivo (Figuerola et al., 2002). A éste efecto excitador se sumaría el provocado por la reducción en la amplitud del PPH (Pineda et al., 1995), lo que resultaría en periodos de intensa actividad regenerativa.

En contraposición a estas influencias excitadoras, la activación de los receptores D2 dotaría a la célula de un mecanismo sumamente eficaz en el control de la excitabilidad de la célula, mediante la inhibición directa de la respuesta excitadora de los receptores D1. Esta acción se sumaría además a otros eventos inhibidores, como la rectificación saliente de la neurona y la actividad GABAérgica ejercida por otras interneuronas en el NE y posiblemente de otras NEMs.

En conclusión, se podría decir que la actividad colinérgica favorecería una disminución en la proporción señal/ruido en la salida de la actividad neoestrial, mientras que la DA, ya sea actuando de manera directa como se ha descrito en esta tesis o de manera indirecta como lo plantean los modelos, aumentaría dicha proporción.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Akaike A, Ohno Y, Sasa M, y Takaori S (1987). Excitatory and inhibitory effects of dopamine on neuronal activity of caudate nucleus neurons in vitro. *Brain Res* 418, 262-272.

Aizman O, Brismar H, Uhlén P, Zettergren E, Levey A, Forsberg H, Greengard P y Aperia A (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nature Neurosci* 3: 226-230.

Albin RL, Young AB y Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12, 366-375.

Andén NE, Fuxe K, Hamberger B y Hökelt TA (1966). A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* 67, 306-312.

Andersen PH y Jansen JA (1990). Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D1 receptor efficacy. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sec* 188, 335-347.

Ariano MA, Larson ER y Noblett KL (1995). Cellular dopamine receptor subtype localization. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 59-70. Austin, TX: Landes.

Armstrong DL, Rossier MF, Shcherbatko AD y White RE (1991). Enzymatic gating of voltage-activated calcium channels. *Ann N Y Acad Sci*, 635, 26-34.

Bading H, Ginty DD y Greenberg ME (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260, 181-186.

Bargas J, Galarraga E y Aceves J (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* 539, 159-163.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y y Surmeier DJ (1994). Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 11, 6667-6686.

Bennett BD y Wilson CJ (2000). Synaptology and physiology of neostriatal neurons. En: Brain dynamics and striatal complex, eds. Miller R y Wickens JR, pp111-140. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Bolam JP y Bennet BD (1995). Microcircuitry of the neostriatum. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 1-19. Austin, TX: Landes.

Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie MD, Machida CA, Neve KA y Civelli O (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336, 783-787.

Bouyer JJ, Park DH, Joh TH y Pickel VM (1984). Chemical and structural analysis of the relation between neocortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res* 302, 267-275.

Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB y Bernardi G (1992). Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 12, 4224-4233.

Cantrell AR, Carter-Russell H, Mermelstein P y Surmeier DJ (1995). Ca²⁺ and Na⁺ currents in acutely-isolated neostriatal neurons from the rat. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 151-163. Austin, TX: Landes.

Catterall WA (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24, 307-323.

Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-555.

Cepeda C, Buchwald NA y Levine MS (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci* 90, 9576-9580.

Cepeda C, Chandler SH, Shumate LW y Levine MS (1995). Persistent Na⁺ conductance in medium-sized neostriatal neurons: characterization using infrared videomicroscopy and whole cell patch-clamp recordings. *J Neurophysiol* 74, 1343-1348.

Cepeda C y Levine MS (1998). Dopamine and N-Methyl-D-Aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20, 1-18.

Cherubini E, Herrling PL, Lanfumey L y Stanzione P (1988). Excitatory amino acids in synaptic excitation of rat striatal neurones *in vitro*. *J Physiol* 400, 677-690.

Chesselet MF, Delfs JM y Mackenzie L (1998). Dopamine control of gene expression in basal ganglia nuclei: striatal and nonstriatal mechanisms. *Adv Pharmacol* 42, 674-677.

Ciliax BJ, Hersch SM y Levey AI (1994). Immunocytochemical localization of D1 and D2 receptors in rat brain. En: Dopamine receptors and transporters, ed. Niznik HB, pp 383-399. Marcel Dekker Inc., New York.

Civelli O, Bunzow JR y Grandy DK (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32, 281-307.

Cooper AJ y Stanford IM (2001). Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA_A IPSCs *in vitro*. *Neuropharmacol* 41, 62-71.

Czubayko U y Plenz D (2002). Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci* 99, 15764-15769.

Dahl SG y Edvardsen Ø (1994). Molecular modeling of dopamine receptors. En: Dopamine receptors and transporters, ed. Niznik HB, pp 265-282. Marcel Dekker Inc., New York.

Dal Toso R, Sommer B, Ewart M, Herb A, Pritchett DB, Bach A Shivers BD y Seeburg PH (1989). The dopamine receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8, 4025-4034.

David DJ y Harrison MB (2002). Colocalization of dopaminergic and muscarinic receptor subtypes on medium spiny striatal neurons in the rat. *Program No. 63.1. 2002 Abstract Viewer/Itinerary planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience. CD-ROM.

Ding L y Perkel DJ (2002). Dopamine modulates excitability of spiny neurons in the avian basal ganglia. *J Neurosci* 22, 5210-5218.

Ebstein RP, Benjamin J, y Belmaker RH (2000). Personality and polymorphisms of genes involved in aminergic neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 410, 205-214.

Falardeau P (1994). Functional distinctions of dopamine D2 long and D2 short receptors. En: Dopamine receptors and transporters, ed. Niznik HB, pp323-342. Marcel Dekker Inc., New York.

Faraci WS, Zorn SH, Sanner MA y Fliri A (1998). The discovery of potent and selective dopamine D4 receptor antagonists. *Curr Opin Chem Biol* 2, 535-540.

Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song WJ, Snyder GL, Nishi A, Cherymy A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault JA, Nestler EJ y Greengard P (1998). DARPP-32: Regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281, 838-842.

Figuroa A, Galarraga E y Bargas J (2002). Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46, 215-223.

Flaherty AW y Graybiel AM (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol* 66, 1249-1263.

Florán B, Floran L, Sierra A y Aceves (1997). D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 237, 1-4.

Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P y Levine MS (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88, 3010-3020.

Foehring RC, Mermelstein PG, Song WJ, Ulrich S y Surmeier DJ (2000). Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 84, 2225-2236.

Foreman MM, Fuller RW, Hynes MD, Gidda JS, Nichols CL, Schaus JM, Kornfeld EC y Clemens JA (1989). Preclinical studies on quinelorane, a potent and highly selective D2-dopaminergic agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 227-235.

Freedman JE y Weight (1988). Single K⁺ channels activated by D2 dopamine receptors in acutely dissociated neurons from rat corpus striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3618-3622.

Freund TF, Powell J y Smith AD (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci* 6, 863-873.

Galarraga E, Bargas J, Sierra A y Aceves J (1989). The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75,157-168.

Galarraga E, Pacheco-Cano MT, Flores-Hernández y Bargas J (1994). Subthreshold rectification in neostriatal spiny projection neurons. *Exp Brain Res* 100, 239-249.

Gardner B y Strange PG (1998). Agonist action at D2(long) dopamine receptors: ligand binding and functional assays. *Br J Pharmacol* 124, 978-984.

Gerfen CR, Engber TM, Mahn LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ y Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429-1432.

Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ y Schwartz JC (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342, 923-926.

Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW y Crabtree GR (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401, 703-708.

Greengard P, Nairn CA, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen BP, Fienberg A, y Nishi A (1998). The DARP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Rev*, 26, 274-284.

Greengard P, Allen PB y Nairn AC (1999). Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435-447.

Greif GJ, Lin YJ, Liu JC y Freedman JE (1995). Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J Neurosci* 15, 4533-4544.

Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhattia M y Borrelli E (1995). Alternative splicing of dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 270, 7354-7358.

Guzmán JN, Hernández A, Galarraga E, Laville A, Vergara R, Erlij D, Valdiosera R, Aceves J y Bargas J (2002). Differential presynaptic modulation of inhibitory inputs to neostriatal projection neurons: dopamine modulates inputs from spiny axon collaterals but not from interneurons. Program No. 164.13. 2002 Abstract Viewer/Itinerary planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. CD-ROM.

Hernández-Echeagary E y Levine MS (2002). D2 dopamine receptor modulation of AMPA currents in striatal medium-sized spiny neurons. Program No. 164.11. 2002 Abstract Viewer/Itinerary planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. CD-ROM.

Hernández-López S, Bargas J, Reyes A y Galarraga E (1996). Dopamine modulates the afterhyperpolarization in neostriatal neurones. *Neuroreport* 7, 454-456.

Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A y Galarraga E (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-Type Ca^{2+} conductance. *J. Neurosci* 17: 3334-3342.

Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H y Surmeier DJ (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability through a novel PLC β 1/IP3/calceineurin signaling cascade. *J Neurosci* 20, 8987-8995.

Herrling PL y Hull CD (1980). Ionophoretically applied dopamine depolarizes and hyperpolarizes the membrane potential of cat caudate neurons. *Brain Res* 192, 441-462.

Herrling PL (1985). Pharmacology of the cortico-caudate excitatory postsynaptic potential in the cat: Evidence for its mediation by quisqualate or kainate receptors. *Neuroscience* 14, 417-426.

Hervé D (1995). Role of GTP-binding proteins, G_s and G_{oif} in the regulation of dopamine D1 receptor responsiveness. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 111-127. Austin, TX: Landes.

Hooper KC, Banks DA, Stordahl LJ, White IM y Rebec GV (1997). Quinpirole inhibits striatal and excites pallidal neurons in freely moving rats. *Neurosci Lett* 237, 69-72.

Horikawua A y Armstrong WE (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci Methods* 15, 5220-5237.

Hu X-T y Wang RY (1988). Comparison of effects of D-1 and D-2 dopamine receptor agonists on neurons in the rat caudate putamen: an electrophysiological study. *J Neurosci* 8, 4340-4348.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ito K, Haga T, Lameh J y Sadee W (1999). Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem* 260, 112-119.

Jiang ZG y North RA (1991). Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones *in vitro*. *J Physiol* 443, 533-553.

Jiang D y Sibley DR (1999). Regulation of D1 dopamine receptors with mutations of protein kinase phosphorylation sites: attenuation of the rate of agonist-induced desensitization. *Mol Pharmacol* 56, 675-683.

Jiménez-Castellanos J y Graybiel AM (1987). Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neurosci* 23, 223-242.

Kabbani N, Negyessy L, Lin R, Goldman-Rakic P y Levenson R (2002). Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22: 8476-8486.

Kawaguchi Y, Wilson CJ y Emson PC (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10, 3421-3438.

Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13, 4908-4923.

Kawaguchi Y y Kubota Y (1995). Local circuit in the rat frontal cortex and the neostriatum. En: Functions of the cortico-basal ganglia loop, eds. Kimura M y Graybiel AM, pp73-88. Springer-Verlag, Tokyo.

Kebabian JW y Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93-96.

Kimura M y Graybiel AM (eds) (1995). Functions of the cortico-basal ganglia loop. Springer-Verlag, Tokyo.

Kita H, Kita T y Kitai ST (1985). Regenerative potentials in rat neostriatal neurons in an *in vitro* slice preparation. *Exp Brain Res* 60, 63-70.

Kiyatkin EA y Rebec GV (1996). Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. *J Neurophysiol* 75, 142-53.

Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R y Bloch B (1990). Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 230-234.

Le Moine C, Normand E y Bloch B (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4205-4209.

Levant B (1997). The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. *Pharmacol Rev* 49, 231-252.

Levine MS, Li Z, Cepeda C, Cromwell HC y Altemus KL (1996). Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse* 24, 65-78.

Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu X, Wang YT, Niznik HB Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and γ -aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403, 274-280.

Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK y Surmeier DJ (2001). D1/D5 Dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persisting sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* 21, 2268-2277.

Magill PJ, Bolam P y Bevan MD (2000). Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci* 20, 820-833.

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Saul J y Watson SJ (1994). Neuroanatomical distribution of dopamine receptor messenger RNAs. En: Dopamine receptors and transporters, ed. Niznik HB, pp265-282. Marcel Dekker Inc., New York.

Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z y Surmeier DJ (1998). Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* 18: 6650-61.

Mermelstein PJ, Foehring RC, Tkatch T, Song WJ, Baranauskas G y Surmeier DJ (1999). Properties of Q-type calcium channels in neostriatal and cortical neurons are correlated with β subunit expression. *J Neurosci* 19, 7268-7277.

Miller R y Wickens JR (eds) (2000). Brain dynamics and striatal complex, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Mink JW (1996). The Basal Ganglia: Focused selection an inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* 50, 381-425.

Missale C, Russel N, Robinson SW, Jaber M y Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78, 189-225.

Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC y Sibley DR (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342, 926-929.

- Montmayeur JP, Guiramand J y Borrelli E (1993). Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol* 7, 161-170.
- Nestler E (1994). Hard target: Understanding dopaminergic neurotransmission. *Cell* 79, 923-926.
- Nicola SM, Surmeier DJ y Malenka RC (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the Striatum and Nucleus Accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23, 185-215.
- Nishi A, Snyder GL y Greengard P. (1997). Bidirectional regulation of DARP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17, 8147-8155.
- Nisenbaum ES y Wilson CJ (1995). The role of potassium currents in the subthreshold responses of neostriatal spiny projection neurons. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 165-181. Austin, TX: Landes.
- Nisenbaum ES, Mermelstein PG, Wilson CJ y Surmeier DJ (1998). Selective blockade of a slowly inactivating potassium current in striatal neurons by (\pm) 6-chloro-APB hydrobromide (SKF82958). *Synapse* 29, 213-224.
- Oorschot DE (2000). The domain hypothesis: A central organizing principle for understanding neostriatal circuitry?. En: Brain dynamics and striatal complex, eds. Miller R y Wickens JR, pp151-163. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E (1996). Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs⁺-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 110, 205-211.
- Parent A, Hazrati LN (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 91-127.
- Pérez-Garci E, Bargas J y Galarraga E (2003). The role of calcium channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14, 1253-1256.
- Pérez-Roselló T, Vilchis C, Salgado H, Figueroa A, Galarraga E y Bargas J (2002). Modulación muscarínica de las corrientes de Ca²⁺ de tipo N y P/Q en las neuronas neostriatales de proyección. Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima, Colima-México.
- Perkel DJ y Farries M (2000). Complementary “bottom-up” and “top-down” approaches to basal ganglia function. *Curr Opin Neurobiol* 10, 725-731.
- Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M y Aceves J (1992). Charybdotoxin and apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 68, 287-294.

Pineda JC, Bargas J, Flores-Hernández J y Galarraga E (1995). Muscarinic receptors modulate the afterhyperpolarising potential in neostriatal neurons. *Eur J Pharmacol* 281, 271-227.

Plenz D y Kitai ST (2000). Adaptive classification of cortical input to the striatum by competitive learning. En: Brain dynamics and striatal complex, eds. Miller R y Wickens JR, pp165-177. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Rajadhyaksha A, Barczak A, Macias W, Leveque JC, Lewis SE y Konradi C (1999). L-Type Ca^{2+} channels are essential for glutamate-mediated CREB phosphorylation and c-fos gene expression in striatal neurons. *J Neurosci* 19, 6348-6359.

Reiner A, Medina L y Veenman CL (1998). Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Rev* 28, 235-285.

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC y Patel YC (2000). Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288, 154-157.

Salgado H, Vilchis C, Pérez-Roselló T, Galarraga E y Bargas J (2002). La activación del receptor dopaminérgico D2 modula corrientes de calcio de tipo P/Q, en las neuronas neostriatales de proyección. Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima, Colima-México.

Schiller J, Schiller Y, Stuart G y Sakmann B (1999). Calcium action potentials restricted to the distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* 505, 605-616.

Schinelli S, Paolillo M y Corona GL (1994). Opposing actions of D1 - and D2-dopamine receptors on arachidonic acid release and cyclic AMP production in striatal neurons. *J Neurochem* 62, 944-949.

Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80, 1-27.

Sealfon SC y Olanow W (2000). Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci* 23, S34-S40.

Seeman P y Van Tol HHM (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15, 264-270.

Selemon LD y Goldman-Rakic PS (1985). Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* 5, 776-794.

Shi L, Simpson MM, Ballesteros JA y Javitch JA (2001). The first transmembrane segment of the dopamine D2 receptor: Accessibility in the binding-site crevice and position in the transmembrane bundle. *Biochemistry* 40, 12339-12348.

- Siegel S y Castellán NJ. Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta. 4ª edición. México. Trillas, 1995 (reimpresión 1998).
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, y Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci* 86, 353-387.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML y Schwartz JC (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347, 146-151.
- Sokoloff P, Andrieux M, Besançon R, Pilon C, Martres MP, Giros B y Schwartz JC (1992). Pharmacology of human dopamine D3 receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D2 receptor. *Eur J Pharmacol* 225, 331-337.
- Sokoloff P y Schwartz JC (1995). Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci* 16, 270-275.
- Stern EA, Kincaid AE y Wilson CJ (1997). Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo. *J Neurophysiol* 77, 1697-1715.
- Strange PG (2001). Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev* 53, 119-133.
- Strange PG (1990). Aspects of the structure of the D2 dopamine receptor. *Trends Neurosci Sci* 13, 373-378.
- Strange PG (1993). Dopamine receptors: structure and function. *Prog Brain Res* 99, 167-179.
- Stuart G y Sakmann B (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367, 69-72.
- Sun XD, Lee EW, Wong EH y Lee KS (2000). ATP-sensitive potassium channels in freshly dissociated adult rat striatal neurons: activation by metabolic inhibitors and the dopaminergic receptor agonist quinpirole. *Pflugers Arch*, 440, 530-47.
- Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, Gelernter JE, Rozmahel R, Yang Y, Israel Y, Seeman P y O'Dowd BF (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347, 80-83.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM y Niznik HB (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350, 614-619.
- Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS y Ariano MA (1993,a). Are neostriatal dopamine receptors colocalized?. *Trends Neurosci* 16, 299-305.

Surmeier DJ y Kitai ST (1993,b). D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. En: Chemical signaling in the basal ganglia, eds. Arbuthnott GW y Emson PC, pp 309-324. Elsevier, Amsterdam.

Surmeier DJ, Cantrell AR y Carter-Russell H (1995,a). Dopaminergic and cholinergic modulation of calcium conductances in neostriatal neurons. En: Molecular and cellular mechanisms of neostriatal function, eds. Ariano MA y Surmeier DJ, pp 193-215. Austin, TX: Landes.

Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC y Greengard P (1995,b). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385-397.

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

Surmeier DJ (2000). Dopaminergic regulation of striatal physiology. En: Brain dynamics and striatal complex, eds. Miller R y Wickens JR, pp195-207. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Uchimura N, Higashi H y Nishi S (1986). Hyperpolarizing and depolarizing actions of dopamine via D-1 and D-2 receptors on nucleus accumbens neurons. *Brain Res* 375, 368-372.

Usiello A, Baik J, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV y Borrelli E (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199-203.

Vallar L y Meldolesi J (1989). Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 10, 74-77.

Vallone D, Picetti R y Borrelli E (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Bio Rev* 24, 125-132.

Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB y Civelli O (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610-614.

Van Tol HHM, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB y Jovanovic (1992). Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358, 149-152.

Vergara R, Rick C, Hernández-López, S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E y Surmeier DJ (2003). Membrane potential oscillations of striatal medium spiny neurons in a corticostriatal slice. *J Physiol*, Enviado.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E y Galarraga E (2000). Ca^{2+} that activate Ca^{2+} -dependent K^+ currents in neostriatal neurons. *Neurosci* 95, 745-752.

West AR y Grace A (2002). Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining *in vivo* intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci* 22, 294-304.

Wickens JR y Oorschot DE (2000). Neural dynamics and surround inhibition in the neostriatum: A possible connection. En: Brain dynamics and striatal complex, eds. Miller R y Wickens JR, pp141-150. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Wilson CJ y Groves PM (1981). Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res* 220, 67-80.

Wilson CJ (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99, 277-297.

Wilson CJ y Kawaguchi Y (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16, 2397-2410.

Wilson CJ (1998). Basal Ganglia. En: The Synaptic organization of the brain, ed. Shepherd GM, 4th Edition, pp 329-375. Oxford University Press, Oxford.

Yan Z, Song WJ y Surmeier DJ (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca^{2+} currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77, 1003-1015.

Yan Z y Surmeier DJ (1997). D5 dopamine receptors enhance Zn^{2+} -sensitive GABA_A currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19, 1115-1126.

Yan Z, Feng J, Fienberg AA y Greengard (1999). D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11607-11612.

Yelnik J (2002). Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord* 17, S15-S16.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN