



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

" Modulación dopaminérgica de las corrientes de calcio en las neuronas neostriatales de proyección".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

HUMBERTO SALGADO BURGOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE BARGAS DIAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento
de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de
la universidad Nacional autónoma de México,
bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz

A lo largo del Doctorado conté con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y
tecnología (CONACYT) y con el complemento de Beca de la Dirección General de
Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM.

El presente trabajo fue financiado por :
DGAPA-UNAM: IN219304, IN201603, IN200803, IN201603.
CONACYT: 31389, 42636.
The Millennium Research Initiative: W- 8072 No. 35806- N.
Firca- NIH: TWO1214.

Dedicatoria

Esta tesis la dedico al incansable espíritu de lucha de mis padres, al apoyo siempre desinteresado de mis hermanas y a mis sobrinos.

A Adriana Hernández por su constante apoyo, solidaridad y compañía en una experiencia más de nuestras vidas.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Bargas Díaz quien me guió en este proceso de formación, por el respeto y la confianza que desde el primer momento me brindó y sobre todo, por su capacidad para compartir el conocimiento durante este tiempo. A la Dra. Elvira Galárraga porque siempre conté con su apoyo y recomendaciones en relación a este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, los doctores Fermín Valenzuela Gómez Gallardo, Juan Carlos Gómora Martínez y David Naranjo Donoso por sus enriquecedores comentarios y sugerencias al presente trabajo.

A los investigadores miembros del jurado

Dr. Ranulfo Romo Trujillo
Dr. José Bargas Díaz
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Dr. Froylan Gómez Lagunas
Dra. Martha Pérez Armendáriz
Dr. José Fernando Peña Ortega
Dr. Rodolfo Delgado Lezama

Quienes con sus comentarios y sugerencias mejoraron este trabajo.

A Carmen Vilchis, Enrique Pérez, Fatuel Tecuapetla, Azucena Pérez y Tamara Pérez por su colaboración en los experimentos que aparecen en el artículo publicado.

Al Biólogo Dagoberto Tapia Ramírez por su ayuda incondicional y valiosos comentarios para la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros: Fatuel, Aleph, Azucena, Tamara, Ernesto, Paco, Jaime, Ramiro, Eden, Salvador, Luís Carrillo, Antonio, Osvaldo, Alejandra, Cesar, Calixto, Luís Galindo, Xochitl, Fernando, Elizabeth y Gaby con los cuales compartí numerosas experiencias. Gracias por su apoyo, amistad y compañía.

Por último, pero no en menor medida, agradezco a mis amigos Marco Atzori, Ernesto, Enrique, Carmen, Perla, Karla, quienes siempre estuvieron dispuestos a apoyarme, con su paciencia, sus conocimientos y su amistad.

A todos ellos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	8
Summary	10
CAPÍTULO 1	12
INTRODUCCION	12
1.1 Ganglios basales	12
1.2 Neostriado.....	17
1.3 La dopamina y sus receptores.....	18
1.4 Los genes de los receptores dopaminérgicos.....	20
1.5 La estructura de los receptores dopaminérgicos	22
1.6 Farmacología de los receptores dopaminérgicos.	24
1.7 Localización celular de los receptores a dopamina.....	28
1.8 Vías de señalización celular activadas por los receptores de dopamina. ...	31
1.9 Los canales de calcio como efectores de la membrana.....	35
1.10 Clasificación de los canales de calcio	36
1.11 Farmacología de los canales de calcio.	39
1.12 Canales de calcio en las neuronas espinosas medianas.....	40
1.13 Modulación de corrientes de calcio por dopamina.	41
1.13.1 Modulación de corrientes de calcio por receptores D ₁	41
1.13.1 Modulación de corrientes de calcio por receptores D ₂	45
CAPÍTULO 2	47
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	47

CAPÍTULO 3	50
OBJETIVOS	50
CAPÍTULO 4	51
MATERIALES Y METODOS	51
4. 1 Preparación celular	51
4.2 Registro electrofisiológico	52
4.3 Fármacos utilizados.	53
4.4 Análisis de los datos	54
CAPÍTULO 5	56
RESULTADOS	56
5.1 Apartado I	57
5.1.1 Corrientes de calcio expresadas en neuronas espinosas medianas disociadas en dos diferentes etapas en el desarrollo	57
5.1.2 Reasignación de los canales de calcio que median la liberación de GABA en las terminales sinápticas de las neuronas espinosas medianas	63
5.1.3 Relación concentración-respuesta del agonista selectivo a la familia de los receptores D ₂ , quinolorane, sobre las corrientes de calcio.....	66
5.1.4 Modulación de las corrientes de calcio por el receptor dopaminérgico D ₂ en neuronas de PD14 y PD40	67
5.1.5 Los cambios en el desarrollo también se reflejan en las terminales sinápticas de las NEMs.....	83
5.1.6 El pospotencial hiperpolarizante (PPH) es ligeramente afectado por el agonista de los receptores D ₂ en las NEMs.....	85
5.2 Apartado II	87

5.2.1 incremento en la corriente de calcio por la activación de los receptores D ₁	88
5.2.2 La activación de los receptores D ₂ impide el efecto producido por los receptores D ₁	90
5.2.3 El efecto dominante de los receptores D ₂ no involucra la inhibición de la adenilato ciclasa.	92
5.2.4 Evidencia sobre la participación de la calcineurina (PP-2B) en el efecto que ejercen los receptores D ₂ sobre los receptores D ₁	95
CAPÍTULO 6	98
DISCUSIÓN	98
6.1 La contribución de los canales de calcio cambia durante el desarrollo.....	98
6.2 Participación del receptor D ₂ en la modulación de la corriente de calcio de la subfamilia Ca _{v2} en las neuronas espinosas medianas.	99
6.3 Participación del receptor D ₂ en la modulación de la corriente de calcio de la subfamilia Ca _{v1} en las neuronas espinosas medianas.	102
6.4 Posible significado funcional del cambio en la modulación dopaminérgica de las corrientes de calcio en las terminales sinápticas.....	103
6.5 Significado funcional de la modulación dopaminérgica de las corrientes de calcio en el patrón temporal de disparo	104
6.6 Acciones opuestas de los receptores D ₁ y D ₂ en la modulación de las corrientes de calcio Ca _{v1} en las neuronas espinosas medianas.....	106
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	113
Abreviaturas	130

Resumen

La dopamina ejerce sus acciones sobre neuronas espinosas medianas neostriatales a través de dos familias de receptores: la familia D₁ (D₁ y D₅) y la D₂ (D₂, D₃ y D₄). En esta tesis de doctorado se estudió el efecto modulador de la activación de los receptores D₂ sobre corrientes de calcio en neuronas de proyección neostriatales en dos etapas del desarrollo de la rata: PD14 (juvenil) y PD40 (adultas). El quinolorane, agonista del receptor D₂, reduce las corrientes de calcio en un 35% en ambas etapas del desarrollo y este efecto fue bloqueado por el antagonista de los receptores D₂, sulpiride. La modulación de los canales Ca_{v1} o tipo L estuvo presente durante el desarrollo, debido a que la nitrendipina ocluyó la modulación mediada por los receptores D₂ en ambas etapas. Sin embargo, la modulación de los canales de calcio de tipo L incrementó durante el desarrollo, de un 20% en la etapa PD14 a un 80% en la etapa PD40. La ω -Conotoxina GVIA, que bloquea los canales de calcio de tipo N, ocluyó gran parte de la modulación en neuronas de la etapa PD14 pero no tiene efecto en neuronas de la etapa PD40. En contraste, la ω -agatoxina TK, que bloquea los canales de calcio de tipo P/Q, ocluye gran parte de la modulación en PD40. Esto indica que la modulación dopaminérgica mediada por los receptores D₂ de los canales de calcio Ca_{v2} cambia de blanco, de canales de calcio Ca_{v2.2} (N) a Ca_{v2.1} (P/Q), durante el desarrollo. Tal modulación fue observada en la inhibición presináptica de los axones colaterales que interconectan neuronas espinosas medianas; indicando que este cambio ocurre en regiones somatodendríticas y en terminales sinápticas,

a tiempos similares. A partir de estos resultados concluimos que la señalización dopaminérgica cambia de efectores durante el desarrollo.

Por otro lado, la activación de los receptores D_1 incrementa corrientes de calcio de tipo L en las neuronas espinosas medianas neostriatales (Surmeier et al 1995; Hernández-López et al 1997). En contraste, los receptores dopaminérgicos D_2 las reducen, sugiriendo una asimetría funcional entre la modulación ejercida por estos receptores sobre las corrientes de calcio. En esta tesis de doctorado, se estudió también la implicación funcional de activar secuencialmente ambos receptores en una misma neurona espinosa mediana. Los agonistas D_2 revirtieron el aumento en la corriente de calcio provocado por los receptores D_1 . Sin embargo, en ningún caso el agonista D_1 , SKF-81297, fue capaz de revertir la acción establecida de los receptores D_2 . Este efecto dominante de los receptores D_2 no involucra la inhibición de la adenilato ciclasa, y depende de un incremento en los niveles del calcio intracelular, así como de la actividad de la calcineurina. Ya que en presencia de BAPTA o de inhibidores de la calcineurina (PICA_N o FK506), el agonista SKF-81297 incrementó las corrientes de calcio. Este hecho pone en evidencia una asimetría funcional entre la interacción D_1 - D_2 .

Summary

Dopamine exerts its actions upon neostriatal medium spiny neurons (MSN) through two receptor families: D₁-like (D₁ and D₅) and D₂-like (D₂, D₃ and D₄). The modulatory effect of D₂ dopamine receptor activation on calcium currents was studied in neostriatal projection neurons at two stages in rat development: PD14 (juvenile) and PD40 (mature young). D₂ receptor agonists (quinelorane) reduced whole cell calcium currents by about 35% at both stages and this effect was blocked by the D₂ receptor antagonist sulpiride. Modulation of Ca_{v1} (L) calcium channels was present throughout development, because nitrendipine occluded D₂-mediated modulation at both stages. However, L-type channel modulation increased during maturation. ω-conotoxin GVIA occluded most of the modulation at PD14 neurons but had no effect at PD40 neurons. In contrast, ω-agatoxin TK occluded a great part of the modulation at PD40; thus indicating that dopaminergic D₂-mediated modulation of Ca_{v2} channels changes target, from Ca_{v2.2} (N) to Ca_{v2.1} (P/Q) calcium channels, during development. This was functionally reflected at both the presynaptic modulation of axon collaterals that interconnect spiny neurons; indicating that this shift occurred at both somatodendritic membrane, and synaptic terminals, at similar times. It is concluded that dopamine signaling changes effectors during development.

On other hand, the activation of D₁-like receptors increases L-type calcium currents in medium spiny neurons (Surmeier et al. 1995; Hernández-López et al., 1997). In contrast, the D₂-like receptors reduce these currents, suggesting a functional asymmetry in the modulation of calcium currents by the activation of

dopamine receptors. In this work we studied the functional implication of activates both receptors sequentially in the same medium spiny neuron. D₂ agonist quinelorane (10 μM) reversed the D₁ augmentation observed in calcium currents. Surprisingly, the D₁ agonist SKF-81297 (1 μM) was always ineffective in reversing the established D₂ effect.

This dominant effect of D₂ dopamine receptors no involve de inhibition of adenilyl ciclase, but depend of the increment in the calcium intracellular and the activity of the calcineurin (PP-2B). In presence of BAPTA or blockers of calcineurin (PICA_N or FK-506), D₁ agonists, SKF-81297, increase the calcium currents, in presence of D₂ receptors agonists. These results put in evidence a functional asymmetry in the D₁/D₂-receptor interaction.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) comprenden núcleos del cerebro anterior y del cerebro medio que juegan un papel importante en el control de la postura y los movimientos (Albin, 1989; Joel y Weiner, 1994, 1997; Mink, 1996; Chesselet y Delfs, 1996). Estos núcleos subcorticales están interconectados. Comprenden a los núcleos caudado (Cd) y putamen (Put) (que constituyen el neostriado - NSt), el núcleo subtálmico (NST), la sustancia negra compacta (SNc), la sustancia negra reticular (SNr), el globo pálido interno (GPi), y el globo pálido externo (GPe) (Albin, 1989; Calabresi, et al, 1996; Mink, 1996; Chesselet y Delfs 1996; Lovinger, 1996; Smith, 1998; Wilson, 2004 y Kalivas y Nakamura, 1999).

Muchas enfermedades del sistema nervioso y del aparato motor están asociadas a disfunciones de los GB, como por ejemplo, el mal de Parkinson, el cuál se manifiesta en posturas anormales del cuerpo, movimientos lentos e involuntarios, rigidez, o una combinación de estas anormalidades (Smith et al.1998 y Mink, 1996). Además, los GB han sido involucrados en procesos complejos como el aprendizaje de programas motores, así como en funciones cognitivas superiores (Schultz, 1998; Miller y Wickers, 2000; Obeso et al. 2000; Middleton y Strick 2000; Wilson 2004).

El NSt constituye la principal entrada de aferencias a los GB, ya que recibe entradas sinápticas glutamatergicas de las distintas regiones de la corteza cerebral. Estas entradas corticales permiten dividir al NSt en dos compartimentos funcionales: el Put que recibe proyecciones de la corteza motora que controla el cuerpo y las extremidades, y por otro lado, la región asociativa que controla la cabeza y el cuello localizada en el Cd. El NSt también recibe entradas glutamatergicas de los núcleos intralaminares del tálamo; y una entrada GABAérgica proviene del Gpe. Una aferencia muy importante para el funcionamiento de los GB la constituyen las fibras moduladoras dopaminérgicas de la SNc, que forman la vía nigroestriatal (Fig. 1) (Parent y Hazrati, 1995; Joel y Weiner, 1994, 1997; Chesselet y Delfs 1996; Smith et al. 1998; Wilson, 1998 y Kita et al. 1999). Las proyecciones que constituyen la vía nigroestriatal provienen de neuronas que sintetizan dopamina. La degeneración de la vía nigroestriatal es la causa de la enfermedad de Parkinson, caracterizada por temblor, rigidez y acinesia (Gerfen, 1992; Lang y Lozano, 1998a, b). El interés de esta tesis es saber cómo funciona la dopamina, es decir, tratar de contribuir al conocimiento de sus mecanismos de acción.

La neurona principal y/o de proyección del neostriado es la neurona espinosa mediana (NEM) cuyo principal neurotransmisor es el ácido γ -amino butírico (GABA). Los axones de estas neuronas proyectan hacia otros núcleos de los ganglios basales. En la figura 1 se muestran las dos vías estriofugales con base al sitio a donde proyectan.

BASAL GANGLIA - THALAMOCORTICAL CIRCUITRY

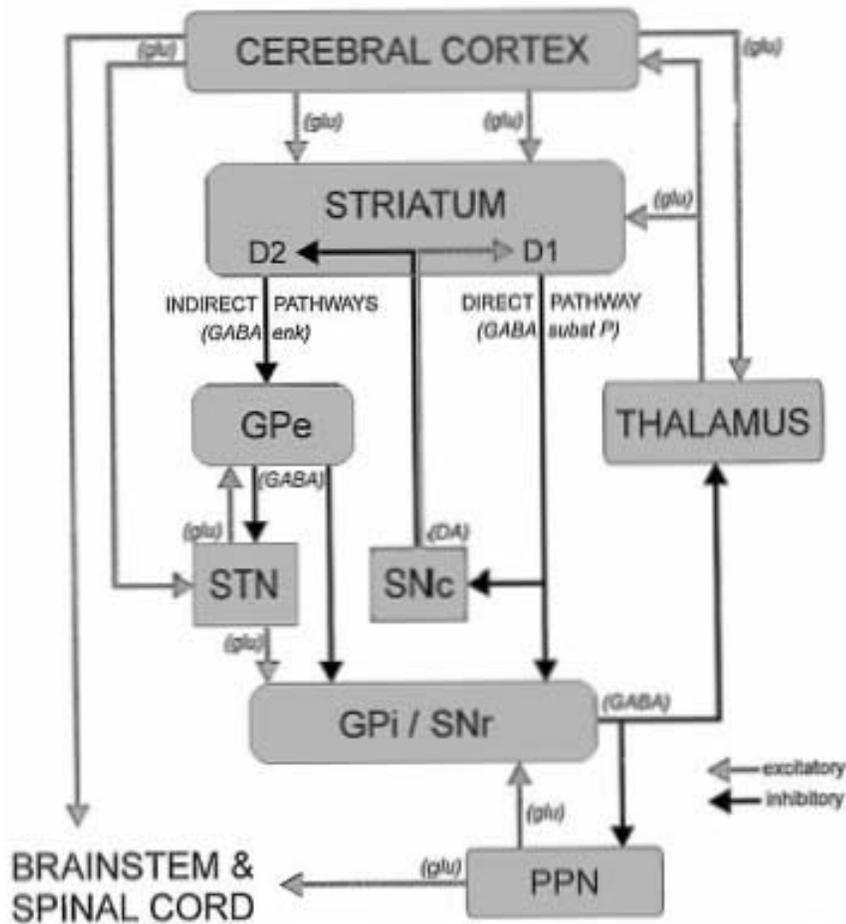


Figura 1. Esquema de la organización anatómica y funcional de los ganglios basales (GB) del mamífero. El estriado o neostriado (NST) es el principal núcleo a donde llegan las aferencias glutamatérgicas de la corteza y el tálamo. El NST envía parte de sus proyecciones gabaérgicas al globo pálido interno (GPI) y la sustancia negra reticulada (SNr), que son los núcleos de salida de los GB. De esta manera, el resultado de sus operaciones regresa a la corteza motora vía el tálamo, o se dirige a las vías descendentes de tallo cerebral como los núcleos pedúnculo pontinos (PPN) y el tectum. La otra parte de las eferencias GABAérgicas del NST se dirigen al globo pálido externo (GPe), que a su vez proyecta al núcleo subtalámico (NST). El NST proyecta a los núcleos de salida (GPI y SNr), además de que recibe aferencias directas de corteza. La sustancia negra compacta (SNc) contiene a las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia todos los GB.

Las dos vías descritas en la figura 1 constituyen las vías “directa” e “indirecta”. Se ha planteado que dichas vías tienen acciones opuestas sobre los

núcleos de salida de los GB. La vía directa facilita el flujo de actividad hacia las áreas motoras de la corteza a través del tálamo, mientras que la vía indirecta lo reprime (para una revisión ver Wilson, 2004).

La vía directa empieza con la proyección excitadora glutamatérgica desde la corteza cerebral (Cx) hacia el NSt. Las NEM, al excitarse, inhiben a las células del GPi y de la SNr, debido a su naturaleza GABAérgica. Las fibras estriatopalidales y estriatonigrales sintetizan y liberan sustancia P junto con el GABA. Las células del GPi y la SNr proyectan hacia las neuronas del tálamo. La actividad espontánea y tónica de GPi y SNr mantiene una frecuencia de disparo tal que se da una inhibición tónica de las neuronas talámicas de relevo que se dirigen a la corteza motora. Mientras estas neuronas están inhibidas, por GPi y SNr, no hay señal a la Cx motora y los movimientos están inhibidos (Fig. 1). Cuando se activan las NEM del NSt debido a un comando motor de la Cx, se produce la inhibición de GPi y SNr, lo cual desinhibe a las neuronas talámicas y por tanto a la Cx y los movimientos. Esto es, una desinhibición producto de dos sinapsis inhibitoras en serie que “libera” los movimientos. El efecto neto de la vía directa es aumentar la actividad del tálamo y, en consecuencia, excitar la corteza cerebral (para una revisión ver en Wilson, 2004).

En paralelo a la vía descrita, está la vía indirecta que pasa por el GPe y el NST. Las NEM neostriatales involucradas en esta vía sintetizan y liberan GABA así como encefalinas, y constituyen la vía striopalidal. Esta vía proyecta al GPe, cuyas neuronas también son GABAérgicas y disparan de manera espontánea. El GPe inhibe tónicamente al NST mediante las fibras pálido-subtalámicas. Así,

cuando se activan las neuronas de la vía estriopallidal se desinhibe el NST. Las neuronas del NST también pueden disparar espontáneamente de manera tónica o en ráfagas (García et al. 2003). Al ser liberadas de la inhibición del GPe, aumentan su frecuencia, cambian su patrón de disparo o ambos, lo que genera una actividad excitadora sobre los núcleos de salida (GPi y SNr). Cuando GPi y SNr aumentan su actividad, se inhiben los circuitos tálamo-corticales lo que abate los movimientos. El efecto neto de la vía indirecta es reducir la actividad del tálamo y, por lo tanto, también de la corteza cerebral (Wilson, 2004). Así, se propone que la activación de la vía directa facilita el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta los disminuye (Mink 1996), es decir, ambas vías tienen efectos contrarios. Mediante estudios de hibridación *in situ*, inmunocitoquímica y la activación de genes tempranos, se ha llegado a la idea de que las neuronas encefalinérgicas de la vía indirecta expresan preferentemente receptores del tipo D2, mientras que las neuronas que sintetizan sustancia P de la vía directa expresan preferentemente receptores del tipo D1 (ver sec. 1.7; Gerfen y Keefe, 1994; Gerfen et al. 1990).

Observaciones recientes han mostrado que las NEM cuyos axones conforman la vía directa, emiten algunas colaterales axónicas hacia el GPe (Parent y Hazrati, 1995), y por otro lado, se ha observado por estudios de transcriptasa reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en célula única (scRT-PCR), que otra población de neuronas coexpresa ambos neuropéptidos: sustancia P (SP) y encefalinas (ENK) (Surmeier et al. 1996), por lo que se ha puesto en duda la estricta clasificación de la salida del NST en estas

dos vías. Por añadidura, también hay receptores D3, D4 y D5 (Surmeier et al., 1996). Así, las neuronas con receptores del tipo D1, pueden también poseer receptores del tipo D3, por ejemplo (Surmeier et al., 1996). Como los agonistas que ahora se usan en el laboratorio y en la clínica no son lo suficientemente selectivos, es común observar que la misma neurona tenga efectos D1 y D2, pues el receptor D3 es capaz de activar una respuesta de tipo D2 (ver abajo La dopamina y sus receptores).

1.2 El neostriado

El neostriado está constituido por varios tipos neuronales, aparte de las neuronas de proyección de las vías directa e indirecta, existen otros tipos de neuronas neostriatales que funcionan como interneuronas locales. Las neuronas de proyección tienen un cuerpo celular de tamaño mediano (12-18 μm de diámetro) y representan más del 90% de la población neuronal de este núcleo en el roedor (Mink, 1996; Lovinger, 1996; Smith, 1998 y Wilson, 1998). Como ya se mencionó las NEMs sintetizan y liberan GABA, que es su principal neurotransmisor, pero como también ya se mencionó, pueden coexpresar péptidos neuroactivos como la sustancia P, las encefalinas y las dinorfinas. Entre las interneuronas locales se encuentra la interneurona colinérgica identificada por la presencia de colin-acetiltransferasa. Su cuerpo celular es elongado y mide entre 50 y 60 μm de largo por 15 a 25 μm de ancho. Representa el 2% de las células estriatales (Kawaguchi, 1995). Otra clase de interneurona neostriatal es inmunoreactiva a parvalbúmina y es GABAérgica. Representa entre el 1 y 2%

de toda la población estriatal. Se caracteriza por tener el cuerpo celular redondo y un tamaño de entre 14 y 15 μm de diámetro (Kawaguchi, 1995). Otra clase más de interneurona GABAérgica es inmunoreactiva a somatostatina y al neuropéptido Y. Estas neuronas expresan la enzima NADPH diaforasa que está involucrada en la síntesis de óxido nítrico. Estas interneuronas representan entre el 1 y el 2% de la población neuronal, su cuerpo celular es esférico con un diámetro de 12 μm (Kawaguchi, 1995; Parent y Hazrati, 1995 y Wilson, 1998).

Todas las neuronas apenas descritas establecen sinapsis con las NEM, modulando su actividad a través de GABA y los péptidos que liberan (Kawaguchi, 1995; Parent y Hazrati, 1995 y Wilson, 1998).

1.3 La dopamina y sus receptores

La dopamina (DA) es un neurotransmisor modulador esencial para el funcionamiento del cerebro de los vertebrados. Regula una gran variedad de funciones incluyendo los movimientos motores voluntarios, la locomoción, el reforzamiento conductual, la sensación de recompensa después de la ejecución de una tarea, el aprendizaje y la memoria, la cognición, las respuestas emotivas, la reacción y la adaptación ante los cambios o ante estímulos imprevistos o “salientes”. Asimismo es necesaria para explicar las adicciones y la dependencia a las drogas (Baik et al. 1995; Greengard et al. 1999; Geengard, 2001; Lubow, 2005; Missale et al. 1998; Salamone et al. 2005; Schultz, 1998; Tobler et al. 2005). Por eso se piensa que el conocimiento de los mecanismos de acción de la dopamina llevará a un mejor entendimiento de todos estos procesos y las

patologías relacionadas con las disfunciones en la transmisión dopaminérgica tales como la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Huntington (HD), la esquizofrenia, el déficit de atención con desorden hiperactivo (ADHD), la drogadicción (a la cocaína, las anfetaminas, los opiáceos, la nicotina y el alcohol), la obesidad y el síndrome metabólico que predisponen a la adquisición de la diabetes mellitus de tipo 2, así como en alteraciones en la función cardiovascular, la secreción de hormonas, el tono vascular, la función renal, la motilidad gastrointestinal, el desorden obsesivo-compulsivo (OCD), la depresión, y otros síndromes motores y endocrinos tales como la distonia, la enfermedad de Tourette, los balismos, la hiperprolactinemia, etc. (Greengard, 2001; Mansvelder et al. 2002 ; Missale et al. 1998 ; Tzschentke, 2001 ; Tanaka, 2005 ; Winterer y Weinberger, 2004 ; Sadile y Viggiano, 2005 ; Viggiano et al. 2004 ; Wang et al. 2002 ; Jenkinson et al. 2000 ; Shigetomi et al. 1995 ; Murphy, 2000 ; Aperia, 2000 ; Wong et al. 1997). Estas relaciones hacen que la investigación de la transmisión dopaminérgica sea un tema de gran actualidad por sus potenciales aplicaciones prácticas, clínicas y farmacológicas.

La DA ejerce su acción al unirse a receptores de membrana específicos (Gingrich y Caron, 1993). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales tienen siete segmentos transmembranales y una alta homología con la rodopsina (Missale et al. 1998).

Kebabian y Calne en 1979 establecieron que los múltiples efectos de la DA podían deberse a su interacción con distintos receptores. En su clasificación de los receptores dopaminérgicos describieron dos familias de receptores: uno

acoplado positivamente a la adenilato ciclasa (AC) denominado D₁ y otro acoplado negativamente denominado D₂. Posteriormente, con la introducción de procedimientos de clonación, nuevos tipos de receptores a dopamina fueron caracterizados. Estos son los D₃ (Sokoloff et al. 1990), D₄ (Van Tol et al. 1991) y D₅ (Sunahara et al. 1991; Tiberi et al. 1991), cuyas características fisiológicas, farmacológicas, así como su secuencia de aminoácidos, les permitían ser catalogados en alguna de las dos familias originales. La familia D₁ está constituida entonces por los receptores D₁ y D₅, ambos receptores estimulan a la AC. A su vez, la familia D₂ está constituida por los receptores D₂, D₃ y D₄ (Civelli et al. 1993; Missale et al. 1998; Vallone et al, 2000). Aunque la visión original destacaba un efecto inhibitorio sobre la AC, descubrimientos posteriores han demostrado que ésta es la vía menos importante para explicar sus acciones (ver abajo en 1.8) (Beaulieu et al. 2005; Gerfen et al. 2002; Hernandez-López et al. 1997; 2000; Nishi et al. 1997).

1.4 Los genes de los receptores dopaminérgicos

La organización genómica de los receptores dopaminérgicos muestra que las dos familias de genes originarios difieren en la presencia de intrones en su secuencia codificadora: Los genes de los receptores D₁ y D₅ no contienen intrones (Civelli et al. 1993; Gingrich y Caron, 1993; O'Dowd, 1993), una característica compartida por muchos receptores acoplados a proteínas G (Dohlman et al. 1990). En contraste, y en analogía con el gen de la rodopsina (Nathans y Hogness, 1983), los genes que codifican para los receptores de la familia D₂ están interrumpidos por intrones y sufren variantes gracias al

procesamiento alternativo (Civelli et al. 1993; Gingrich y Caron, 1993; O'Dowd, 1993). La localización de intrones en la familia de genes que codifica para los receptores D₂ es similar. El gen que codifica para el receptor D₂ se caracteriza por poseer seis intrones (Dal Toso et al. 1989; Giros et al. 1989; Mosnma et al. 1989), el receptor D₃ posee 5 intrones (Sokoloff et al. 1990), y el receptor D₄ posee tres intrones, de los cuales, el primero y el segundo se asemejan a los primeros dos intrones del receptor D₂ (Van Tol et al. 1991).

El cDNA del receptor D₂ fue el primero en ser aislado (Bunzow et al. 1988), este contiene 1245 nucleótidos que codifican a una proteína de 415 aminoácidos. Posteriormente se estableció una isoforma del receptor D₂ el cual contiene 444 aminoácidos la cual es generada por 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; Mosnma et al. 1989). El gen del receptor D₃ codifica para una proteína de 446 aminoácidos y fue clonado al hibridizar una biblioteca de cDNA del cerebro de rata con una sonda derivada de la secuencia del receptor D₂ (Sokoloff et al. 1990). A partir de una biblioteca de una línea celular de neuroblastoma humano se obtuvo la clonación del receptor D₄ (Van Tol et al. 1991).

Mediante el empleo de bibliotecas génicas (Dearry et al. 1990; Sunahara et al. 1990), así como el empleo de la técnica de PCR aplicada en células estriatales (Zhou et al. 1990), fue clonado el receptor D₁. El gen de este receptor codifica para una proteína de 446 aminoácidos. Posteriormente, utilizando la secuencia del receptor D₁, se aisló el segundo miembro de esta subfamilia, al que se llamó D₅ (Sunahara et al. 1991). El gen genera una proteína de 475 aminoácidos.

1.5 La estructura de los receptores dopaminérgicos

El análisis de la estructura de los receptores dopaminérgicos indica que los miembros de la misma familia (tipos) tienen un alto grado de homología. Así, los receptores tipo D₁ y tipo D₅ comparten un 80% de similitud en sus dominios transmembranales. Sin embargo, cuando los comparamos con los tipos de la otra familia la homología decae: los receptores tipo D₂ solo comparten un 30% de homología en su secuencia de aminoácidos con los de tipo D₁ (Sunahara et al. 1991). Así mismo, los dominios transmembranales de los receptores tipo D₂ y tipo D₃ son homólogos en un 75% (Sokoloff et al. 1990); mientras que los tipo D₄ conservan un 53% de homología con respecto a los receptores D₂ y D₃ (Van Tol et al. 1991).

El segmento NH₂- terminal de ambas familias tiene un número similar de aminoácidos (entre 20 y 39), y poseen un número variable de sitios consenso de glucosilación. Los receptores de la familia D₁ poseen solo un sitio susceptible de ser glucosilado, mientras que los receptores D₂ tienen cuatro sitios, los receptores D₃ poseen 3 y los receptores D₄ poseen un solo sitio (Van Tol et al. 1991; Sunahara et al. 1991).

El segmento COOH-terminal de los receptores de la familia D₁ es siete veces más largo que el de la familia D₂ (ver en Missale et al. 1998). Este segmento es rico en residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados. Se supone que esta región regula la desensibilización homóloga y heteróloga de dichos receptores (Vallone et al 2000). Por otro lado, este segmento contiene un residuo de cisteína que es conservado en todos los

receptores acoplados a proteínas G. En los receptores D₁, este residuo de cisteína está localizado en el principio del COOH-terminal. En los receptores D₂ se encuentra localizado en la región final. Los receptores dopaminérgicos, al igual que en los receptores β-adrenérgicos y el receptor de rodopsina, poseen un sitio de palmitoilación que podría corresponder al sitio de anclaje de la cola citoplasmática del receptor a la membrana celular (Strange, 1990a,b; Missale et al. 1998). Como todos los receptores acoplados a proteínas G, los receptores a DA poseen dos residuos de cisteína en las asas extracelulares dos y tres. Se ha sugerido que estos residuos forman un puente disulfuro que estabiliza la estructura del receptor (Civelli et al. 1993; Gingrich y Caron, 1993; O'Dowd, 1993; Fraser, 1989; Jackson y Danielsson, 1994).

Las dos familias de receptores dopaminérgicos difieren en el número de aminoácidos en la tercera asa intracelular. La familia D₁ se caracteriza por tener una tercera asa intracelular corta en comparación con la familia D₂. En el caso de los receptores D₁, esta asa ha sido asociada con el acople a una proteína G_s, lo que promueve la estimulación de una AC y el incremento en el AMPc intracelular. Por el contrario, los receptores D₂ poseen un segmento largo en la tercera asa intracelular e interaccionan con proteínas G_{i/o} que inhiben a la AC (Civelli et al. 1993; Strange. 1993; Missale et al. 1998; Sealfon y Olanow, 2000). Es a este nivel, donde las isoformas del receptor tipo D₂ se configuran de manera alternativa: la isoforma larga (D₂-largo) se caracteriza por poseer una porción adicional de 29 aminoácidos (Dal Toso et al. 1989; Giros et al. 1989; Monsma et

al. 1989). Aunque la tercera asa intracelular de los receptores D₁ y D₅ es muy corta, sí divergen en su secuencia (Missale et al. 1998).

Estudios de mutagénesis en receptores a catecolaminas (Kgelsberg et al. 1992; Strader et al. 1988, 1989), así como modelos tridimensionales de los receptores β_2 y α_2 adrenérgicos, así como D₂ dopaminérgicos, han sugerido que la unión con el agonista ocurre en el interior de una bolsa formada por los dominios transmembranales hidrofóbicos (Hibert et al. 1993, 1993; Trumpp-Kallmeyer et al. 1992). Así, hay residuos altamente conservados en el centro mismo de esta bolsa de la proteína que deben corresponder al sitio de unión (Hibert et al. 1993). En particular, hay un residuo de aspartato en el tercer dominio transmembranal que está involucrado en afianzar al grupo amino de la DA (Hibert et al. 1993; Strader et al. 1988), mientras que otros dos residuos de serina en el quinto dominio transmembranal se encargarían de establecer puentes de hidrogeno con los grupos hidroxilo del catecol. Por último, un residuo de fenilalanina localizado en el sexto dominio transmembranal establece interacciones ortogonales con el anillo aromático del agonista (Fig. 2) (Edvardsen y Dahl, 1994; Missale et al. 1998).

1.6 Farmacología de los receptores dopaminérgicos

Las propiedades farmacológicas de los diferentes receptores dopaminérgicos han sido extensamente estudiadas. Ello se debe a sus potenciales aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de múltiples patologías

(ver arriba en 1.3) (Seeman y Van Tol, 1994; Sokoloff y Schwartz, 1995; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000).

Los ligandos dopaminérgicos claramente discriminan entre las familias de receptor D₁ y D₂. Sin embargo, no son tan selectivos a la hora de comparar los distintos tipos de una misma familia. Esto ha llevado a múltiples contradicciones y datos incoherentes en la literatura, como por ejemplo, la hibridización *in situ* encuentra segregación de los tipos D₁ y D₂ en diferentes neuronas (ver 1.7 abajo, Le Moine et al. 1991; Le Moine y Bloch, 1995; Gerfen, 1990; Bergson et al. 1995) mientras que los ensayos farmacológicos encuentran las dos respuestas, D₁ y D₂, en la misma célula (Pérez-Garcí et al. 2002; Surmeier et al. 1996).

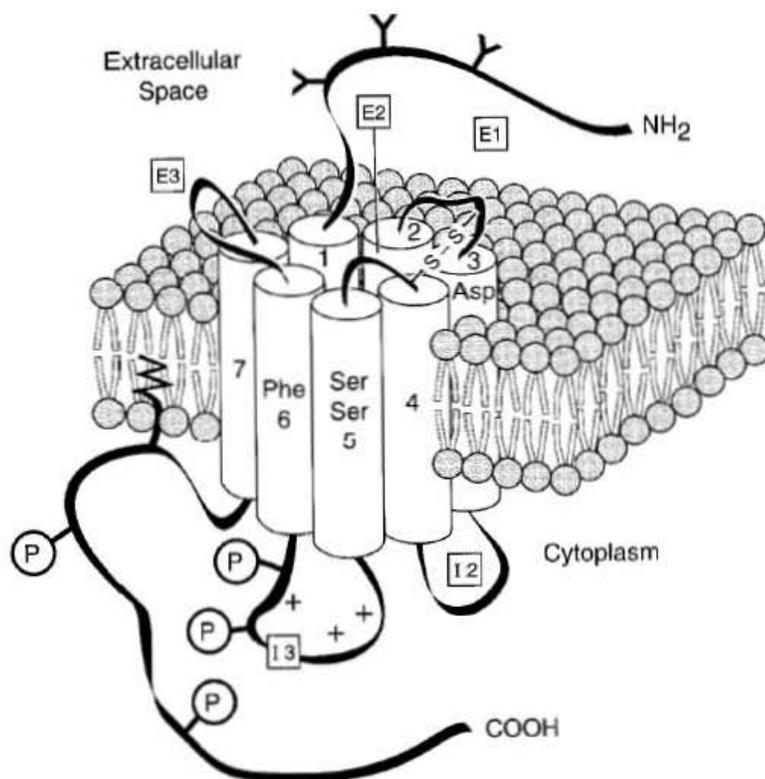


Figura 2. Estructura del receptor dopaminérgico de la familia D₁. Los receptores de la familia D₁ se caracterizan por poseer un segmento COOH-terminal más largo y una tercera asa intracelular (I3) más corta que los receptores D₂. Los aminoácidos aspartato (Asp) en el segmento transmembranal 3, las dos serinas (Ser) en el segmento 5, y una fenilalanina (Phe) en el segmento 6, están implicados en la interacción de la dopamina con el receptor. Los sitios de fosforilación se indican en el segmento COOH-terminal e I₃, mientras que en el segmento NH₂-terminal se localizan residuos susceptibles de ser glicosilados. Dos residuos de cisteína en las aspas extracelulares E₁ y E₂ establecen un enlace disulfuro manteniendo la estructura terciaria del receptor. La familia D₁ contiene a los tipos D₁ y D₅. La familia D₂ contiene a los tipos D₂, D₃, y D₄. Tomada de Missale *et al.* (1998).

Así, el agonista SKF-81297 es muy selectivo para la familia D₁ pero no distingue entre los tipos D₁ y D₅ en un ensayo funcional. Sin embargo, los estudios de pegado muestran una afinidad 10 veces mayor para la DA del receptor tipo D₅ sobre el tipo D₁ (Sunahara *et al.* 1991; Tiberi *et al.* 1991). Las

propiedades farmacológicas de la familia de receptores D_2 revelan que hay agonistas y antagonistas que son más o menos selectivos, aunque nunca de manera completa, además de que falta probarlo en más preparaciones. Por ejemplo, el receptor tipo D_3 es 20 veces más afín por la dopamina que el receptor tipo D_2 (Sokoloff et al. 1990). ¿Esto quiere decir que el efecto terapéutico para la enfermedad de Parkinson está dado por los receptores D_3 ? Este es uno de los tantos problemas que no han sido debidamente aclarados.

Entre las familias, D_1 y D_2 , de receptores dopaminérgicos sí hay diferencias notables en su afinidad por los diferentes ligandos. Por ejemplo, la familia de receptores D_2 (tipos D_2 , D_3 , D_4) es, en general, más afín por la DA que los receptores de la familia D_1 (tipos D_1 y D_5). La familia de receptores D_1 , tienen una baja afinidad por la DA, la K_D reportada para estos es de 2-4 μM , mientras que para los receptores D_2 es menor a 50 nM (Richfield et al. 1999). Esto hace pensar que la acción tónica de la DA está dada por los receptores D_2 , mientras que la acción fásica, debida a una elevación brusca de la concentración, está dada por los receptores D_1 (Giros et al. 1996; Suaud-Chagny et al. 1995). Además, esta diferencia en la afinidad hace que en aquellos experimentos en que simplemente se añade DA a la preparación, lo que se observa de manera preponderante son las acciones D_2 . Esto a su vez obliga a usar agonistas selectivos y preguntarse ¿en qué situaciones fisiológicas predominan las acciones del receptor D_1 ?

Entre los agonistas más selectivos para la familia D_2 , se encuentra el *quinelorane*. Como muchos otros agonistas, esta molécula se pega tanto al receptor tipo D_2 como al tipo D_3 , así la K_D para el receptor tipo D_2 es de 341 nM,

mientras que para el tipo D₃ es de 3.6 nM (Foreman et al., 1989; Sokoloff et al., 1992). En este sentido, el ligando tiene hasta 100 veces mayor afinidad para la isoforma D₃ en comparación con la isoforma D₂.

Otro de los agonistas utilizados es el quinpirole, el cual posee una K_D de 576 nM para la isoforma D₂, mientras que para la isoforma D₃ es de 5.1 nM. Este fármaco también tiene afinidad para la isoforma D₄ (Sokoloff et al., 1990).

Dentro de los agonistas selectivos de la familia D₁ se encuentran las *benzazepinas*, de éstas, uno de los ligandos más potentes es el SKF-81297. Este fármaco posee una K_D de 2.2 nM y en ensayos farmacológicos una EC₅₀ de 18 nM para estimular a la enzima adenilato ciclasa (AC). La K_D para los receptores D₂ es de alrededor de 10 μM (Andersen y Jansen, 1990). Nótese que las diferencias en afinidad de las dos familias de receptores, para los fármacos diseñados, es similar a la encontrada para la DA. Así es que la DA, bien podría considerarse un “agonista” selectivo de los receptores D₂.

1.7 Localización celular de los receptores a dopamina.

En 1990 Gerfen y colaboradores utilizando sondas para hibridización *in situ* en neuronas espinosas medianas identificadas como estriato-nigrales, o de la vía directa, simultáneamente al uso de trazadores retrógrados, encontró que un amplio porcentaje de éstas células mostraba mRNA del receptor tipo D₁, así como para los péptidos sustancia P y dinorfina. En contraste, sólo un porcentaje pequeño de estas neuronas (≈ 17 %) expresaba mRNA para los receptores tipo D₂ y/o el neuropéptido encefalina. Casi de manera simultánea Le Moine y

colaboradores (1991), reportaron resultados similares utilizando la misma metodología. Por otro lado, las neuronas inmunoreactivas al neuropéptido encefalina (striato-palidales o de la vía indirecta) mostraban la presencia del mRNA para el receptor del tipo D₂ y muy pocas expresaban mRNA para el receptor tipo D₁ (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1990). De estos resultados surgió la hipótesis de la segregación de los receptores dopaminérgicos, tipos D₁ y D₂, en las neuronas de proyección estriatales: D₁ para la vía directa y D₂ para la vía indirecta.

Este modelo segregacionista de la expresión de receptores dopaminérgicos ha sido de gran importancia para los modelos anatómicos y funcionales, aún en boga, de la fisiología y fisiopatología de los ganglios basales y las acciones fisiológicas y terapéuticas de los agonistas dopaminérgicos, incluyendo la L-DOPA. Sin embargo otros trabajos en los que se utilizaron metodologías diferentes, tales como la inmunohistoquímica, han puesto en duda dicha segregación, reportando niveles significativos de colocalización de ambos tipos de receptor (Ariano et al. 1995; Aizman et al. 2000; David y Harrison, 2002) en un gran número de neuronas. Sin embargo, como es sabido que los anticuerpos pueden ser menos sensibles que la técnica de hibridización (reacciones cruzadas), el modelo ha persistido.

Sin embargo, mediante el uso de la transcripción reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en células únicas (scRT-PCR) disociadas del neostriado dorsal de la rata, Surmeier y colaboradores (1993a y 1996; Nicola et al., 2000) mostraron que neuronas que expresan substancia P (vía directa) y

abundante mRNA del receptor tipo D₁ (el 46 % de las neuronas analizadas), también co-expresaban niveles apreciables de mRNA de alguno de los tipos de receptor D₂: tipo D₂ (19 %), tipo D₃ (38 %) y tipo D₄ (25 %). Esto es, aunque la hipótesis de la segregación resultara correcta, con la selectividad de los agonistas ahora disponibles, debe de ser muy común que una misma neurona exhiba respuestas D₁ y D₂ simultáneamente. Asimismo, muchas neuronas con mRNA para encefalina (vía indirecta) (26% de las neuronas) y abundante mRNA para los receptores tipo D₂, co-expresaban mRNA para las isoformas D₁ o D₅. Finalmente, una población de NEMs (29 % de las neuronas analizadas) expresaban substancia P, encefalina y mRNA de los tipos D₁ y D₂. Así se concluye que cuando menos el 50% de las células co-expresa algún miembro de una familia con algún miembro de la otra (D₁ y D₂) (Surmeier et al. 1996). Esto pone en cuestionamiento la relevancia funcional de la segregación, o cuando menos hace que las preguntas: ¿Por qué tantos receptores?, ¿Para qué sirve cada uno?, ¿Cuándo predomina uno y cuando el otro?, adquieran importancia.

1.8 Vías de señalización celular activadas por los receptores de dopamina

Similarmente a las acciones de otros receptores de la superfamilia de siete dominios transmembranales cuyas señales son transducidas a través del acoplamiento con las proteínas G, la activación de la familia de los receptores dopaminérgicos promueve la iniciación de diferentes cascadas de señalización intracelular que tienen como objeto modificar la actividad de diferentes efectores moleculares en las células.

Los receptores a dopamina activan proteínas G heteroméricas ($G_{\alpha\beta\gamma}$) al promover la substitución de GDP por GTP en la subunidad G_{α} (Gilman, 1987). Al separarse, ambas subunidades, G_{α} y $G_{\beta\gamma}$, activan o inhiben una gran variedad de proteínas hasta llegar a los efectores blanco. En la presente tesis, los efectores que nos interesan son los canales iónicos. Estos pueden ser regulados a través de su fosforilación por proteínas cinasas, y su desfosforilación vía proteínas fosfatasas. En particular, se ha observado que muchos canales también pueden ser regulados directamente por las proteínas G mediante interacciones proteína-proteína entre alguna subunidad de la proteína G y un asa intracelular del propio canal (Hille, 1994; Selbie and Hill, 1998; Dolphin et al., 1999).

En el caso de los receptores dopaminérgicos D_1 se sabe que la señalización comienza activando la AC y aumentando los niveles intracelulares de AMPc (Missale et al., 1998). Efecto mediado por proteínas G_s y G_{olf} en las neuronas estriatales y en otras (Herve, 1993). En contraste, los receptores dopaminérgicos D_2 disminuyen los niveles de AMPc en diferentes tipos celulares. Este efecto inhibitor es mediado por proteínas $G_{i/o}$ sensibles a la toxina *pertussis*

(Vallar y Meldonesi, 1989; Missale, 1998). También se ha descrito que ambos tipos de receptores activan la vía de los fosfoinosítidos vía proteínas G_q (Vallar et al. 1990; Jin et al. 2003; Hernández-López et al. 2000).

Entre los canales que son los blancos finales de la señalización dopaminérgica se encuentran los de calcio (Gómora et al. 1996; Surmeier et al. 1996; Hernández-López et al. 1997 y 2000). Pero se conoce que la dopamina también puede afectar a canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, así como canales sinápticos (ionotrópicos) tales como los NMDA, AMPA y GABA (Cepeda et al. 1993; Tseng and O'Donnell, 2004; Pisani et al. 2000). Al ser afectadas múltiples conductancias iónicas de la membrana, la neurona blanco, como ejemplo, la estriatal, cambia su manera de integrar la información (la función entrada-salida; I/O o de transferencia), esto es, su capacidad de generar patrones temporales de disparo ante un determinado estímulo es modificada (Hernández-López et al. 1997; 2000; Pérez-Garcí et al. 2003), así como su capacidad de comunicarse con otras neuronas (Gúzman et al., 2003; ver resultados de la presente tesis y Salgado et al. 2005). Esto modifica el procesamiento y la actividad de toda la red neural. Así, La activación selectiva de los receptores D_1 promueve la reducción de corrientes de sodio en neuronas espinosas medianas neostriatales, este efecto es mimetizado por análogos del AMPc (Surmeier y Kitai, 1993b) y se debe a la fosforilación directa del canal por la PKA (Nicola et al. 2000). Similarmente, en neuronas piramidales de la corteza prefrontal, la activación de receptores D_1 disminuye corrientes de sodio, por la vía AMPc y PKA; esta última fosforila al canal (Maurice et al., 2001). Otro blanco para la vía de señalización de

los receptores D_1 , son los canales de potasio activados a potenciales hiperpolarizados (< -80 mV) y que median la rectificación entrante en las NEMs (Nisenbaum y Wilson, 1995; Mermelstein et al., 1998).

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

Con respecto a la activación de los receptores dopaminérgicos D_2 , en las neuronas neostriatales se ha visto que los efectos más importantes no derivan de su acción negativa sobre la AC, si no que se deben a la activación de la fosfolipasa C (PLC), lo que a su vez desencadena una cascada que termina en otra fosfatasa, la PP-2B, que defosforila y deprime la acción de los canales de calcio de tipo L (Nishi et al., 1997, Hernandez-López et al., 2000). También se sabe que la activación de los receptores D_2 reduce corrientes de sodio en interneuronas colinérgicas neostriatales a través de la vía de la fosfolipasa C (PLC) y la PKC (Maurice et al. 2004).

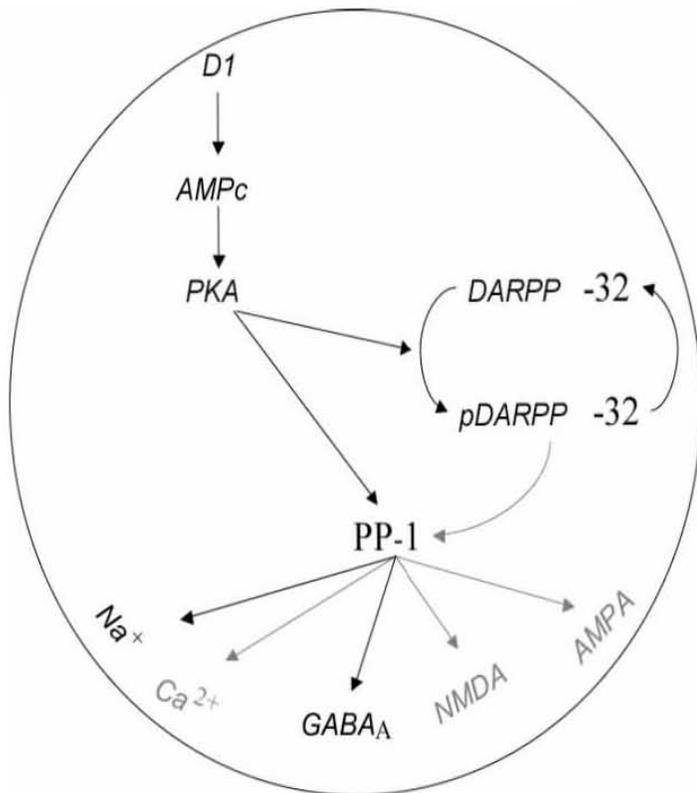


Figura 3. Papel central de la vía DARPP32/PP-1 por activación del receptor D1 en las neuronas espinosas medianas. La vía DARPP32/PP-1 integra la información y produce una respuesta coordinada involucrando varios efectores. Flechas negras indican procesos de activación y flechas grises indican procesos inhibidores. Un incremento en la fosforilación de DARPP-32 por PKA, promueve la inhibición de la actividad de PP-1, incrementando el nivel de fosforilación de múltiples proteínas efectoras. El incremento en la fosforilación esta asociado con un incremento en la actividad de los receptores AMPA y NMDA, así como en los canales de Ca²⁺ de tipo L, y con un decremento en la actividad de los receptores

GABA_A y de los canales de Na⁺ (Modificado de Greengard et al. 1999).

Por otro lado, la activación de los receptores D1 puede potenciar las respuestas mediadas por los receptores sinápticos AMPA y NMDA (Cepeda et al. 1993; Tseng and O'Donnell, 2004). Por su parte los receptores D₂ deprimen las respuestas de los mismos receptores (Tseng and O'Donnell, 2004).

Además, los receptores dopaminérgicos también activan otras vías de señalización tales como Akt-GSK, GRK y MAPK (Beaulieu et al. 2005; Gerfen et al. 2002; Nishi et al. 1997), pero no se sabe cual es la relación de ninguna de estas cascadas con las acciones electrofisiológicas, y por lo tanto, con la actividad neuronal. Además, todas estas vías se han descrito en condiciones patológicas y no sabemos cuál sería su función durante la transmisión normal.

1.9 Los canales de calcio como efectores en la membrana.

La actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje es central en la función de todas las células excitables (células que disparan potenciales de acción autorregenerativos) y aun en células no excitables (Hille, 2001).

Los canales de calcio median la entrada de calcio a la célula en respuesta a una depolarización de la membrana. Por sí mismo, el calcio es un segundo mensajero que regula procesos intracelulares como la contracción, la secreción, la liberación de neurotransmisores y la expresión génica, entre otros (Catterall, 1995; Dunlap et al. 1995).

La clonación y caracterización molecular de las subunidades de los canales de calcio ha ayudado a conocer su estructura, fisiología y farmacología. Estos canales son originados por una superfamilia de genes de canales iónicos transmembranales que incluyen a los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje (Catterall, 1995).

Los canales de calcio han sido caracterizados bioquímicamente como proteínas complejas compuestas de cuatro o cinco subunidades, las cuales son codificadas por múltiples genes (Catterall, 2000). La subunidad α_1 incorpora al poro de conducción, el sensor de voltaje y sitios de regulación del canal por segundos mensajeros, drogas y toxinas. Esta subunidad se organiza en cuatro dominios homólogos (I-IV) con seis segmentos transmembranales cada uno (S1-S6). El segmento S4 funciona como el sensor de voltaje (Fig. 4). El poro del canal se encuentra formado por los segmentos S5 y S6 de cada dominio y junto con el asa del poro proporcionan la selectividad y la conductancia al canal (Fig. 4). Una

subunidad β intracelular y una subunidad $\alpha_2\delta$ transmembranal son componentes de muchos tipos de canal de calcio. Además, la subunidad γ ha sido encontrada en canales de calcio del músculo esquelético y en canales expresados en corazón y cerebro (Fig. 4). Se sabe que las subunidades auxiliares $\alpha_2\delta$, β , y γ modulan la cinética de activación e inactivación; así como la densidad de corriente y la unión de los diferentes bloqueadores (Varadi et al. 1995; Catterall, 1996 y 1998). A pesar de la diversidad funcional que les confiere la presencia de todas estas subunidades accesorias, la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los canales de calcio es debida principalmente a la existencia de múltiples subunidades α_1 (Hofmann et al. 1994).

1.10 Clasificación de los canales de calcio

Existen 10 genes que codifican para las subunidades α_1 de los canales de calcio. Históricamente, varios nombres han sido asignados a los productos de estos genes y la nomenclatura ha sido muy confusa. Desde su descubrimiento, la clasificación de los canales de calcio ha sido desarrollada en cuatro etapas. La primera clasificación de estos canales fue basada en su dependencia de voltaje. Los canales se dividieron en dos grupos. Un grupo fué el de los canales que necesitaban despolarizaciones pequeñas para ser activados y el otro el de aquellos que necesitaba una mayor despolarización: LVA (low voltaje activated) y HVA (high voltaje activated) (Hagiwara et al., 1975; Llinas y Sugimori, 1980; Llinas y Yarom, 1981).

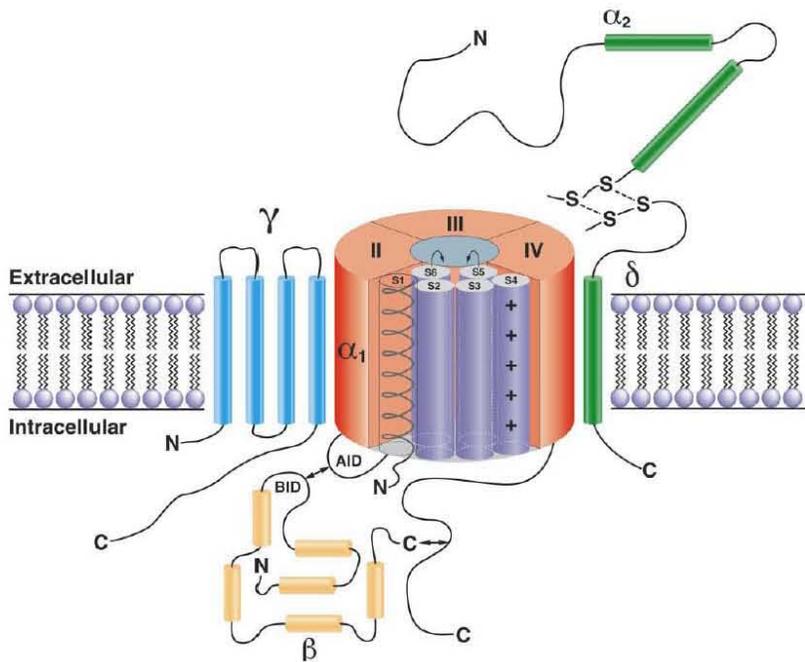


Figura 4. Esquema genérico de un canal de calcio dependiente de voltaje. El esquema ilustra los 4 dominios homólogos de la subunidad α_1 que forman el poro del canal. El dominio 1 muestra los seis segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 es el sensor de voltaje y el asa que se forma entre el segmento S5 y S6 de cada dominio forma la

cubierta de la boca del poro. Asociadas con la subunidad α_1 se encuentran la subunidad β , que es intracelular, la subunidad γ que tiene cuatro segmentos transmembranales y la subunidad $\alpha_2\delta$ (tomada de Randall y Benham, 1999).

La siguiente clasificación utilizó herramientas farmacológicas. Nowycky y colaboradores (1985) subdividieron los canales LVA y HVA en más subtipos funcionales y dieron una nomenclatura alfabética: T (LVA), L y N (HVA). Posteriormente la nomenclatura fue basada en las diferentes subunidades α_1 , las cuales fueron referidas como α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1F} y α_{1S} (Birnbaumer et al. 1994) y α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} (Monteil et al. 1999; Williams et al. 1999). Las subunidades α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} forman el poro de los canales de calcio de tipo T (LVA), en tanto que las subunidades de los canales HVA son α_{1A} (P/Q), α_{1B} (N), α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} y α_{1S} (L) y α_{1E} (R) respectivamente (ver Tabla 1). El año 2000 es testigo de otra nomenclatura, la cual trata de englobar no sólo a los canales de calcio si no a todos los canales iónicos (Ertel et al. 2000). Así, los canales de calcio fueron

nombrados usando el símbolo químico del principal ión de permeación (Ca), junto con el principal regulador fisiológico (el voltaje), indicado como subíndice: Ca_v. Tres subfamilias de canales de calcio fueron definidas con base en la homología de las secuencias de aminoácidos: Ca_v1, Ca_v2, Ca_v3, respectivamente. Acorde a esta nomenclatura la subfamilia Ca_v1 (Ca_v1.1 a Ca_v1.4) incluye canales de calcio que contienen las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} , las cuales median las corrientes de calcio de tipo L (Tabla 1). La subfamilia Ca_v2 (Ca_v2.1 a Ca_v2.3) incluye canales que contienen las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} , las cuales median corrientes de calcio de tipo P/Q, N y R, respectivamente (Tabla 1); y la subfamilia Ca_v3 (Ca_v3.1 a Ca_v3.3) que incluye canales que contienen las subunidades α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} , las cuales median corrientes de calcio de tipo LVA (Ertel et al. 2000). Las secuencias completas de los aminoácidos de las subunidades α_1 son idénticas en un 80% en una misma subfamilia pero hay menos del 40% de homología entre las diferentes subfamilias. Por ejemplo, las subunidades α_1 de los canales de la subfamilia Ca_v1 tienen un 80% de identidad en su secuencia. Sin embargo, al comparar la secuencia de la subfamilia Ca_v1 contra la Ca_v3 la identidad de su secuencia de aminoácidos solo es del 28% (Ertel et al. 2000). A estas alturas, la fisiología, la farmacología, la bioquímica y la biología molecular están intentando, mediante el trabajo multidisciplinario, contestar las siguientes preguntas: ¿Por qué tantos canales de Ca²⁺ en una sola célula?, ¿Cuál es la función de cada uno?, ¿Trabajan en conjunto?, ¿Cómo afectan el disparo, la actividad, la sinapsis, y las funciones de una red neuronal y una neurona? Combinando ambas partes de esta introducción, nos preguntamos: ¿Para qué

toda esta complejidad de receptores y canales?, además, ¿Para qué la DA cambia la función a los mismos?, ¿Cuántas variables hay?, ¿Llegaremos a entender cómo funcionan los neurotransmisores moduladores como la DA?, ¿Cómo correlacionar las cadenas de señalización con la actividad de los circuitos neuronales? Dada la complejidad de este panorama, en esta tesis sólo abordaremos uno de los efectores: el canal de calcio.

Por otro lado, la capacidad neuromoduladora puede experimentar cambios en el desarrollo los cuales están asociados con cambios en la expresión de canales iónicos (Elezgarai, 1999). Estos cambios en la expresión de los canales durante el desarrollo pueden ser muy importantes para el control de la actividad y función de una red neuronal. Por lo tanto, uno puede suponer que la expresión temporal de cada tipo de canal se puede ligar con procesos críticos durante el desarrollo. En el caso de los canales de calcio, se ha reportado que su contribución varía en diferentes etapas del desarrollo (Chameau et al. 1999; Iwasaki, 2000).

1.11 Farmacología de los canales de calcio

La farmacología de las tres subfamilias de canales de calcio es muy distinta. Los canales Ca_v1 son los blancos moleculares de las dihidropiridinas (como la nitrendipina, nicardipina, BayK) (ver tabla 1). Estos canales también son sensibles a la calciseptina, un péptido del veneno de la serpiente *Dendroaspis polylepis polylepis* (mamba negra), la cual los bloquea selectivamente siendo totalmente inactiva sobre otros canales de calcio (De Weille et al. 1991 y Yasuda

et al. 1993). Hasta la fecha no existen agonistas o antagonistas específicos para cada subtipo de canal Ca_v1 .

La subfamilia de canales de calcio Ca_v2 es virtualmente insensible a las dihidropiridinas pero estos canales son bloqueados con alta afinidad por toxinas péptidicas de arañas y caracoles marinos (Tabla 1) (Kochegarov, 2003). Así, los canales $Ca_v2.1$ (P/Q) son bloqueados específicamente por la ω -agatoxina IVA (Mintz et al, 1992) y la ω -agatoxina TK (ω -AgaTK) (Teramoto, 1993, 1995 y 1997) extraídas del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. Los canales $Ca_v2.2$ (N) son bloqueados específicamente por la ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) del veneno del caracol marino *Conus geographus* (Olivera et al. 1985; Witcher et al. 1993; Fujita et al. 1993; Jones et al. 1997; Angulo et al. 1998). Los canales $Ca_v2.3$ son bloqueados de manera relativamente selectiva por la toxina SNX-482 derivada del veneno de la tarántula *Hysterocrates gigas* (Arrollo et al. 2003).

La subfamilia Ca_v3 es sensible a la toxina, kurtoxina, del veneno del escorpión *Parabuthus transvaalicus*, y al mibefradil (Pérez-Reyes, 2002; Kochegarov, 2003).

1.12 Canales de calcio en las neuronas espinosas medianas

Las NEMs expresan diferentes subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje, tanto de la subfamilia Ca_v1 como de la subfamilia Ca_v2 (Bargas et al. 1994, Foehring et al. 2000; Mermelstein et al. 1999). Está en duda si algún tipo de NEM, en la dendrita, expresa canales de la familia Ca_v3 (Sabatini et al. 2001). Las NEM expresan dos tipos de canal de calcio Ca_v1 : α_{1C} ($Ca_v1.2$) y α_{1D} ($Ca_v1.3$).

Además, expresan todos los miembros de canal de calcio de la subfamilia Ca_v2 : los canales P/Q ($Ca_v2.1$), N ($Ca_v2.2$) y R ($Ca_v2.3$) (Bargas et al. 1994, Foehring et al. 2000; Mermelstein et al. 1999). En las NEM, las corrientes de calcio son muy importantes en la generación del patrón de disparo neuronal. Los canales de calcio de tipo L (Ca_v1) generan una zona de conductancia negativa que sostiene el disparo repetitivo durante el estado activo de estas células (Hernández- López et al. 1997; Vergara et al. 2003). Por su parte los canales de calcio de tipo $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante (PPH) (Vilchis et al. 2000), que determina el ritmo y la frecuencia de disparo. Además, el calcio que entra a través de estos canales, induce la liberación del neurotransmisor de las terminales sinápticas de estas neuronas (Tecuapetla et al. 2005). Esto muestra que los diferentes canales de calcio desempeñan funciones diferentes en la misma célula.

1.13 Modulación de corrientes de calcio por dopamina

1.13.1 Modulación de corrientes de calcio por receptores D_1 .

La activación de los receptores dopaminérgicos D_1 incrementa las corrientes de calcio de tipo L en las NEM neostriatales (Surmeier et al. 1995), en células cromafines (Artalejo et al. 1990), y en células horizontales y ganglionares de la retina (Pfeiffer-Linn y Lasater. 1993; Liu y Lassater, 1994). Este incremento de la corriente de calcio (ICa^{2+}) fue mimetizado por un análogo del AMPc y por activadores de la proteína cinasa A (PKA). Lo anterior sugiere que la acción del receptor D_1 es mediada por el sistema canónico: AMPc / PKA (Artalejo et al. 1990; Pfeiffer-Linn y Lasater, 1993 y Surmeier et al. 1995), de manera análoga a la

modulación producida por la PKA sobre los canales de calcio de tipo L cardíacos cuando se estimula el receptor β -adrenérgico (Yue et al, 1990; Kamp y hell, 2000). Se ha probado que la PKA de manera directa fosforila y provoca cambios conformacionales en el canal (Naguro et al. 2001).

Tabla 1. Nomenclatura y farmacología de los canales de calcio dependientes de voltaje (Modificado de Doering y Zamponi, 2003; Kochegarov, 2003).

Superfamilia	Tipo	Subunidad α 1	Nombre propuesto	Bloqueador selectivo
HVA	L	α_{1C}	$Ca_v1.2$	Dihidropiridinas
	L	α_{1D}	$Ca_v1.3$	Dihidropiridinas
	L	α_{1F}	$Ca_v1.4$	Dihidropiridinas
	L	α_{1S}	$Ca_v1.1$	Dihidropiridinas
	N	α_{1B}	$Ca_v2.2$	ω -conotoxina GVIA
	P/Q	α_{1A}	$Ca_v2.1$	ω -agatoxina IVA ω -agatoxina TK
	R	α_{1E}	$Ca_v2.3$	SNX-482
LVA	T	α_{1G}	$Ca_v3.1$	Kurtoxina Mibefradil
	T	α_{1H}	$Ca_v3.2$	Kurtoxina Mibefradil
	T	α_{1I}	$Ca_v3.3$	Kurtoxina Mibefradil

El incremento de la corriente de calcio por DA se debe a tres mecanismos: primero, la fosforilación por PKA incrementa la conductancia unitaria a través de los canales individuales. Bajo la influencia de dopamina, la conductancia del canal unitario se duplica. Segundo, la dopamina incrementa la probabilidad de apertura del canal. Y tercero, la dopamina incrementa el tiempo de apertura media del canal de calcio (Pfeiffer-Linn y Lasater, 1996). En contraste, la activación del receptor D_1 tiene acciones opuestas sobre las corrientes de calcio de tipo T en las células horizontales de la retina (Pfeiffer-Linn y Lasater, 1993) y esta inhibición también es mediada por AMPc. De manera paralela, también se ha descrito que la activación de los receptores D_1 promueve la disminución de las corrientes de calcio de los tipos N y P/Q. Este efecto también es mimetizado por análogos del AMPc y bloqueado por inhibidores de la PKA (Surmeier et al., 1995).

Ahora bien, aunque esta vía es canónica, tiene varias complicaciones en las NEM. Resulta que la PKA fosforila y aumenta la actividad de la proteína fosfatasa-1 (PP-1), que, anclada junto al canal, lo desfosforila rápidamente apenas es activada. Entonces, mientras PKA fosforila al canal, al mismo tiempo activa a PP-1 que lo desfosforila, siendo el efecto casi instantáneo. ¿Cuál es entonces la acción fisiológica, aumentar o disminuir la corriente? ¿Para qué un efecto tan breve? Este dilema se resolvió mediante registros intracelulares, que al contrario de los registros de célula entera, y aun los de parche perforado, no modifican el medio intracelular. La respuesta es que la ICa^{2+} de tipo L aumenta bajo la acción de la DA y este aumento persiste por varios minutos (Hernández-

López et al. 1997). En registros de célula entera se obtiene el mismo resultado en presencia de inhibidores de fosfatasas, como el ácido okadaico y la microcistina (Surmeier et al., 1995), lo que permite proponer que existe un inhibidor endógeno de fosfatasas que cumple ese papel en la célula intacta. Este es precisamente el papel que cumple el DARPP-32, que se activa al ser fosforilado por PKA (ver Fig. 5).

En el caso de los canales N y P/Q, se piensa que el efecto predominante es la desfosforilación mediante PP-1 (Surmeier et al., 1995). Esta acción también se ha observado en NEM del núcleo accumbens, sobre las corrientes N y R (Zhang et al., 2002).

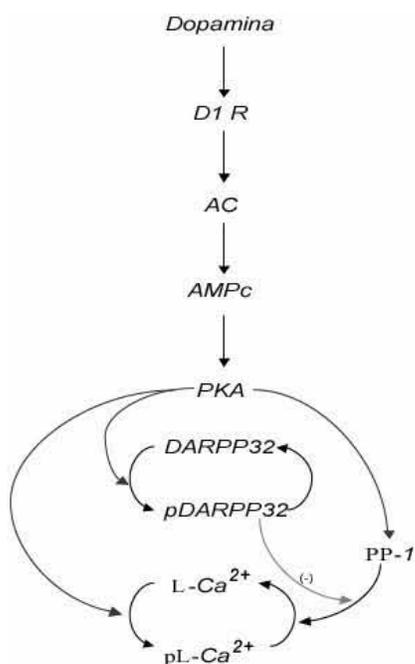


Figura 5. Vía de señalización propuesta para la modulación del canal de tipo L de Ca²⁺ por el receptor D1. Note que la vía es iniciada por AC y la producción de AMPc. Sin embargo, la PKA activada puede inducir fosforilación por tiempo muy limitado ya que también activa a la PP-1 que desfosforila. Para que la fosforilación dure más, la PKA debe de activar a DARPP-32 que inactiva a PP-1. Uno de los temas de estudio actuales en relación a esta vía, es el análisis de los factores que activan o desactivan DARPP-32 (ver Greengard et al. 1999; Surmeier et al. 1995; Hernández-López et al. 2000).

Resultados similares en respuesta a la activación del receptor D_1 han sido reportados en células cromafines (Artalejo et al. 1990) y en células horizontales y ganglionares de la retina (Pfeiffer-Linn y Lasater. 1993; Liu y Lassater, 1994).

1.14 Modulación de canales de calcio por receptores D_2

La activación de la subfamilia de receptores D_2 regula la función de corrientes de calcio en múltiples tipos celulares. Una de las células más caracterizadas es la NEM, en donde la estimulación del receptor dopaminérgico D_2 reduce la corriente de calcio a través de los canales de calcio de tipo L resultando en una disminución de la excitabilidad (Hernández-López et al., 2000). Esta modulación es mediada por la activación del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G_q la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), que promueve la movilización de calcio de las pozas intracelulares y la activación de la fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina (PP-2B), la cual desfosforila el canal de calcio (Hernández-López et al., 2000). Los receptores D_2 también modulan la ICa^{2+} de tipo L en motoneuronas espinales y en células granulares del cerebelo a través de una manera independiente de voltaje (Wikstrom et al., 1999 y Mei et al 1995). En melanotropos también se ha descrito que la activación de los receptores D_2 reduce la ICa^{2+} de tipo L, así como la expresión del gen para esta subunidad (Fass et al, 1999). La Figura 6 esquematiza esta vía de señalización. También se ha reportado que la activación de los receptores D_2 modula corrientes de calcio de tipo N en interneuronas colinérgicas estriatales, en células NG108-15 y en motoneuronas espinales a través de una vía delimitada a membrana y utilizando una proteína G_i/G_o (Yan et al, 1997; Brown y Seabrook, 1995 y Wikstrom et al

1999). Sin embargo, en neuronas del globo pálido la vía de activación termina en la proteína cinasa C (PKC), en este caso, la fosforilación reduce la corriente. En células AtT20 y en neuronas dopaminérgicas, la activación del receptor D2 reduce la ICa^{2+} de tipo P/Q por una vía delimitada a membrana (Wolfe et al. 1999; Cardozo y Bean, 1995). Poco se sabe de los otros tipos de receptor que son miembros de la familia D2: la activación del receptor D₃ causa una reducción de la ICa^{2+} de tipo P/Q vía proteínas G sensibles a la toxina pertussis (Kuzhikandathil y Oxford, 1999), y la activación del receptor D₄ inhibe las ICa^{2+} de tipo L en células granulares del cerebelo (Mei et al., 1995).

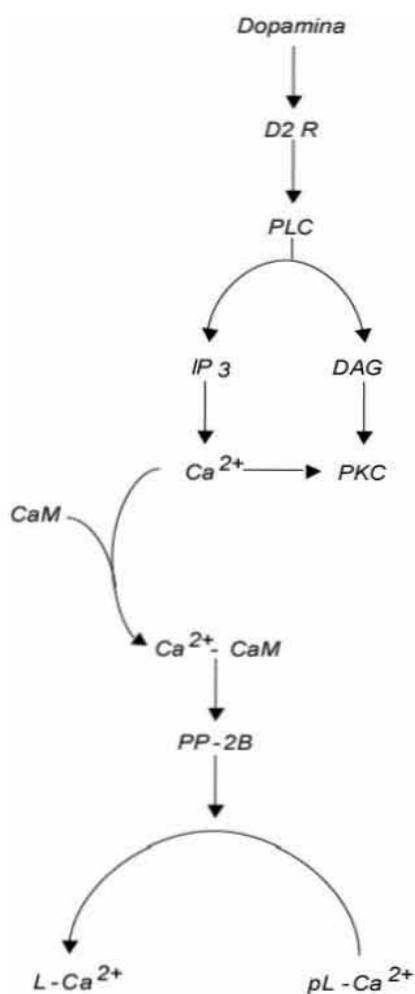


Figura 6. La activación del receptor D2 tiene efectos contrarios a los del receptor D1 al modular el canal de calcio de tipo L: se reduce la corriente. La vía comienza con la activación de PLC, que a su vez produce IP3 y DAG y calcio intracelular. Este último activa a la Ca-CaM, que a su vez activa a la PP-2B. La PP-2B desfosforila al canal reduciendo la corriente (Nishi et al., 1997; Hernández-López et al., 2000).

CAPITULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En algunas áreas del sistema nervioso central, los tipos de canal de calcio de la sinapsis, encargados de disparar la liberación del neurotransmisor, cambian sus proporciones durante el desarrollo. Por ejemplo, los canales de calcio de tipo N disminuyen su expresión mientras que los de tipo P/Q la incrementan (Iwasaki et al. 2000). En general, se desconoce si esto sucede sólo en la membrana sináptica, o si cambios paralelos acontecen en la membrana somatodendrítica. Este punto no ha sido analizado en las NEM por lo que es uno de nuestros objetivos.

Debido a que se prefiere estudiar animales jóvenes en las preparaciones diseñadas para analizar las propiedades sinápticas (rebanadas de cerebro), no sabemos si lo encontrado a edades tempranas aplica en el animal adulto. Así, en este trabajo de tesis investigamos la contribución relativa de los diferentes tipos de canal de calcio en dos etapas del desarrollo: PD14 y PD40 (días postnatales 14 y 40). Investigamos que tipos de canal de calcio contribuyen a la corriente iónica y a la transmisión sináptica estudiando en paralelo la membrana somatodendrítica y la sinapsis.

El papel que juegan los diferentes tipos de canal de calcio en estas neuronas es múltiple, entre otras cosas, regulan el patrón de disparo y la liberación de neurotransmisor, aunque cada tipo de canal asume un rol diferente en estos procesos (Bargas et al., 1994; Pérez-Garcí et al., 2003). Ahora bien, la dopamina, actuando a través de receptores de tipo D₁ y D₂, modula de manera diferencial

estos canales. Esta es una manera en que la dopamina controla la generación del patrón temporal de disparo y la transmisión sináptica. Los trabajos previos de este laboratorio se concentraron en la modulación dopaminérgica del canal de calcio de tipo L (Ca_v1), y cómo esta modulación controla el disparo neuronal (Hernández-López et al., 1997; 2000). Los canales de calcio de tipo L no participan de manera evidente en la liberación de neurotransmisor (Bargas et al., 1998; Barral et al 2001). También se sabe que la activación de receptores de la familia D_1 reduce la corriente a través de los canales de la subfamilia Ca_v2 (N, P/Q y R) (Surmeier et al., 1995). Pero falta averiguar si la dopamina, a través de los receptores de la familia D_2 , también modula los canales de la subfamilia Ca_v2 . El presente trabajo se inscribe dentro de esta línea de investigación y tratamos de dar cuenta del papel modulador de los receptores D_2 (en especial de los receptores D_2/D_3), sobre las corrientes de calcio Ca_v2 durante dos etapas del desarrollo: PD14 y PD40. Como ya mencionamos, existen evidencias de una colocalización de receptores dopaminérgicos de ambas familias, D_1 y D_2 , en una misma neurona espinosa mediana (ver Introducción). Pero no sabemos cual es el resultado de activar simultáneamente estos receptores en la misma neurona.

En el caso de la modulación de la corriente de calcio de tipo L (Ca_v1), la modulación dopaminérgica es antagónica (ver Introducción): la activación de receptores de la familia D_1 incrementa la corriente mientras la activación del receptor dopaminérgico D_2 la reduce. Entonces, ¿qué pasa cuando ambos receptores son activados? ¿Cómo interaccionan las vías de señalización esquematizadas en las Figuras 5 y 6? En este trabajo de tesis comenzamos a

estudiar la implicación funcional de activar las dos familias de receptores dopaminérgicos simultáneamente.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Determinar la contribución de los diferentes tipos de canales de calcio en las neuronas espinosas medianas del neostriado en dos etapas del desarrollo: PD14 (juveniles) y PD40 (adultos).

Determinar si el receptor dopaminérgico D_2 modula la corriente de calcio a través de los canales Ca_v2 en neuronas espinosas medianas del neostriado en las dos etapas del desarrollo antes mencionadas.

Definir él (los) subtipo (s) de canales de calcio Ca_v2 modulado (s) por el receptor dopaminérgico D_2 en las dos etapas del desarrollo antes mencionadas.

Analizar la posible interacción de los receptores D_1 y D_2 durante la modulación de la corriente de calcio en las neuronas espinosas medianas.

CAPITULO 4

MATERIALES Y METODOS

3.1 Preparación celular

En el presente estudio se utilizaron ratas de la cepa Wistar. Después de ser anestesiadas con eter, se decapitaron y su cerebro fue obtenido y sumergido en solución salina a 4°C, que contiene (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 NaHCO₃, y 11 glucosa (pH 7.4 con NaOH, 298 mOsm/l; saturada con 95% CO₂ y 5% O₂). Del cerebro se obtuvieron rebanadas sagitales de 300 µm de espesor usando un vibratomo (Ted Pella, Reading CA). Una vez obtenidas, las rebanadas de cerebro se dejaron equilibrar durante una hora a temperatura ambiente (≈25°C) en la misma solución salina. Después se disecó el neostriado dorsal y se incubó en la misma solución salina adicionada con 1 mg/ml de pronasa E tipo XIV (Sigma; St. Louis, MO, EUA) a 32°C. Después de 20 minutos de digestión, las rebanadas se pasaron a una solución salina con baja concentración de calcio (0.2 mM CaCl₂). En esta solución, las neuronas fueron disociadas mecánicamente utilizando una serie de pipetas Pasteur con diferente diámetro en la punta. La suspensión celular (1 ml) se colocó en una caja Petri montada sobre la platina de un microscopio invertido que contiene 1 ml de la solución salina de registro (en mM): 0.001 tetrodotoxina (TTX), 130 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES y 10 de glucosa (pH = 7.4 con NaOH; 300 mOsm/l con glucosa).

3.2 Registro electrofisiológico

Las neuronas espinosas medianas, disociadas agudamente, se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula entera usando BaCl_2 (5 mM) como acarreador de carga. Se utilizaron electrodos de borosilicato (WPI; Sarasota, FL) hechos en un estirador de pipetas (Sutter Instrument Corp, Novato, CA) y pulidos en la punta mediante una microforja (Narichige; Tokio, Japón) hasta obtener resistencias de 4-8 $\text{M}\Omega$ en la solución salina extracelular. Estas pipetas fueron llenadas con la siguiente solución interna (que contiene en mM): 10 etilenglicol-bis-(β -aminoetil eter) ácido N,N-tetracético (EGTA), 140 N-metil-D-glucamina, 4 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 40 HEPES, 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina (pH = 7.2 con H_2SO_4 , osmolaridad = 270 ± 5 mOsm/l). Medidas potenciométricas mostraron que la concentración de calcio alcanzada en la solución intracelular con estos componentes es de 150-200 nM. Los registros se obtuvieron con un amplificador Axopatch 1D (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), y fueron monitoreados y controlados con una PC acoplada a una interfase a 125 KHz corriendo el programa pClamp (v. 8) (Axon Instruments). Después de romper el gigasello y entrar en contacto con el interior celular compensamos la resistencia en serie ($< 15 \text{ M}\Omega$) en un 70-80 %. Y se vigilo periódicamente durante el experimento.

Realizamos medidas de la función corriente-voltaje (curvas I-V), antes y después de utilizar los agonistas dopaminérgicos. Estas se hicieron de dos maneras: ya sea con la familia de corrientes evocadas por comandos de voltaje

desde -80 hasta 50 mV en pasos de 10 mV, o bien con la corriente obtenida al aplicar un comando de voltaje en forma de rampa (0.14 mV/ms) desde -80 a 50 mV. Como ambos métodos coincidieron en casi todas las células registradas (ver la Fig. 1B de los Resultados en: Salgado et al., 2005 –artículo adjunto), decidimos sólo mostrar las curvas I-V obtenidas con las rampas de voltaje, para mayor claridad. En varios experimentos también se aplicaron protocolos de doble comando rectangular para ver si parte de la inhibición era a través de una vía dependiente de voltaje.

Los fármacos se aplicaron utilizando la gravedad mediante un capilar de vidrio posicionado a 100-200 μm de la neurona que se registraba. Para cambiar la solución extracelular usamos un sistema de microválvulas (Lee CO, Essex, CT) controladas a distancia mediante voltaje. El curso temporal de los efectos de los agonistas y bloqueadores se obtuvo midiendo los valores de corriente al pico en respuesta a la rampa de voltaje, o bien, obteniendo la amplitud de la corriente al finalizar un escalón de voltaje a 0 mV.

3.3 Fármacos utilizados.

Los fármacos se disolvieron en la solución salina a partir de soluciones madre preparadas diariamente. El quinelorane, el SKF-81297, la nitrendipina, el sulpiride y el U99194A se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Los antagonistas de los canales de calcio: ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx) y ω -agatoxina TK (ω -AgaTK) se obtuvieron de Peptides International o de Alomone Labs. El ácido okadaico se obtuvo de Alomone Labs. Los inhibidores de la fosfatasa PP-2B

(calcineurina), FK506, microcistina y el péptido auto-inhibidor se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA). El BAPTA se obtuvo de Calbiochem.

La mayoría de los fármacos se disolvieron en agua para preparar las soluciones madre. La nitrendipina, el ácido okadaico y la microcistina se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) al (0.01%). En esos casos las soluciones control tenían DMSO a la misma concentración final.

3.4 Análisis de los datos

Los registros digitalizados fueron importados para ser analizados y graficados con un programa comercial (Origin v. 6. Microcal, Northampton, MA). Reportamos media y error estándar para los valores de corriente. La significancia estadística fue evaluada mediante pruebas estadísticas libres de distribución: U de Mann-Whitney o T de Wilcoxon, dependiendo de que tipo de muestras se comparaban. También usamos análisis de varianza (ANOVA) para comparar más de dos muestras simultáneamente utilizando un programa comercial (Systat v.10; SPSS Inc., Chicago IL).

La relación concentración-efecto del agonista selectivo para la familia de receptores D₂, quinolorane, fue ajustada a la ecuación de Hill:

$$\frac{E}{E_{\max}} = \frac{[A]^{nH}}{[A]^{nH} + [A]_{50}^{nH}}$$

donde E es el efecto producido por el quinolorane sobre la amplitud de la corriente medido en porcentaje, E_{max} es el efecto máximo normalizado al 100% para poder obtener la relación de diferentes células, [A] es la concentración del

agonista, $[A]_{50}$ es la concentración eficaz 50 (el 50% de E_{max}) y nH es el coeficiente de Hill.

Para aproximar la contribución relativa de cada tipo de canal de calcio, se tomó la cantidad de corriente de calcio bloqueada por un antagonista dado (nitrendipina para el canal de calcio de tipo L, ω -Aga TK para el de tipo P/Q, y ω -CgTx para el de tipo N). Para determinar la contribución de los canales de tipo R se aplicaron conjuntamente los tres bloqueadores y se midió la corriente resistente. La suma de estas corrientes fue normalizada a 100 % de modo que $L + N + P/Q + R = 100\%$. Para determinar la cantidad de modulación del quinolorane para cada tipo de canal de calcio, se comparó la modulación del quinolorane en ausencia y presencia de los diversos bloqueadores de calcio y se introdujo los datos en un sistema lineal de ecuaciones (ver en Vilchis et al. 2002).

CAPITULO 5

RESULTADOS.

Los resultados que a continuación se presentan fueron obtenidos en NEMs disociadas agudamente. Los registros de la actividad eléctrica se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje en célula completa. Han sido divididos en dos apartados: en el primero se describe el papel modulador que juegan los receptores D₂ sobre las corrientes de calcio en dos etapas del desarrollo: PD14 y PD40. En el segundo, se presenta evidencia electrofisiológica de la interacción funcional entre ambas familias de receptor dopaminérgico, D₁ y D₂, en una misma neurona. Esta interacción se obtuvo observando la modulación de la corriente de calcio.

4.1 APARTADO I.

En la primera parte de esta tesis utilizamos un agonista selectivo para los receptores de la familia D_2 , el quinelorane, junto con antagonistas específicos para los diferentes tipos de canales de calcio, para estudiar el efecto de la activación del receptor de la familia D_2 sobre los canales de calcio de la familia Ca_v2 .

4.1.1 Corrientes de calcio expresadas en neuronas espinosas medianas disociadas en dos diferentes etapas en el desarrollo.

La figura 7A muestra una familia de corrientes obtenida en respuesta a comandos despolarizantes de voltaje en una NEM PD14, utilizando Ba^{2+} como acarreador de carga. Un experimento similar en una NEM PD40 se muestra en la figura 7B. La figura 7C muestra la $I_{Ca^{2+}}$ obtenida en la misma neurona PD14 (mostrada en la figura 7A) pero ahora en respuesta a un comando en forma de rampa despolarizante de -80 a 50 mV. Un experimento similar se muestra en la figura 7D en una neurona PD40. Las figuras 7E y F, muestran las relaciones voltaje-corriente (curva V-I), obtenidas de los experimentos mostrados en las figuras 7C y D, graficadas en función de los valores de la rampa de voltaje. Observe que la curva V-I producto de la rampa de voltaje se superpone a la producida con comandos rectangulares de voltaje (de hecho parece un ajuste de los puntos); indicando que ambos métodos de registro coinciden. Por este motivo,

en la mayoría de los experimentos solo se muestran las corrientes obtenidas en respuesta a rampas de voltaje; aunque en muchos casos, los datos se corroboraron con pasos de voltaje.

El histograma en la figura 7G compara la amplitud media de la $I_{Ca^{2+}}$ en ambas etapas del desarrollo. En neuronas PD14, la amplitud al pico de corriente es de 234 ± 14 pA ($n = 49$), mientras que en neuronas PD40 es de 254 ± 12 pA ($n= 54$; esta diferencia no es estadísticamente significativa de PD14; U de Mann-Whitney). La densidad de corriente se compara en la figura 7H; dividiendo la corriente iónica entre la capacitancia celular total. La capacitancia de las células PD14 dissociadas es de 7.3 ± 0.2 pF, mientras que en las PD40 es de 7.5 ± 0.3 pF (esta diferencia no es estadísticamente significativa, U de Mann-Whitney), indicando que la superficie somática no cambia al comparar estas dos etapas de desarrollo. Por otro lado, la densidad de corriente es de 32 ± 2.2 pA/pF en PD14 y 34 ± 1.4 pA/pF en PD40 (Fig. 7H; esta diferencia no es estadísticamente significativa, U de Mann-Whitney). Estos resultados muestran que el número total de canales de calcio no cambia en estas dos etapas del desarrollo.

Nos enfocamos a dilucidar cuales son los canales de calcio que contribuyen a la corriente total en cada una de las dos edades, debido a que los tipos de canal de Ca^{2+} pueden sufrir cambios en su expresión durante el desarrollo (Chameau et al., 1999). Para lo cual se realizó una disección farmacológica de las corrientes de calcio en ambas etapas, PD14 y PD40, utilizando bloqueadores específicos de los diferentes tipos de canal de calcio.

La figura 8A muestra que, en neuronas PD14, 10 μM de nitrendipina bloquea el $29 \pm 3\%$ ($n=15$) de la ICa^{2+} , mientras que en neuronas PD40, el porcentaje de la ICa^{2+} bloqueada es de $23 \pm 2\%$ ($n=24$, esta diferencia no es estadísticamente significativa, U de Mann-Whitney; Fig. 8C). Por lo tanto se concluyó que los canales de calcio de tipo L (Ca^{2+}_v1) no cambian su número entre estas dos etapas del desarrollo. Experimentos similares se realizaron usando el bloqueador de las canales de calcio $\text{Ca}_v2.1$ (tipo P/Q), la $\omega\text{-AgaTK}$ (400 nM). Este péptido redujo la ICa^{2+} en neuronas de PD14 en un $24 \pm 3\%$ ($n = 7$; Fig. 8D), mientras que redujo la amplitud de la ICa^{2+} en un $40 \pm 1\%$ en neuronas de PD40 ($n = 15$; Fig. 8E). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 8F; $P < 0.0001$; U de Mann-Whitney); indicando que los canales de calcio de tipo P/Q incrementan su expresión y su contribución relativa a la ICa^{2+} total entre los días 14 y 40 del desarrollo. Pero si uno de los tipos de canal aumenta ¿cómo es que se mantiene inalterada la corriente total?

Experimentos equivalentes se realizaron usando el bloqueador de los canales de calcio $\text{Ca}_v2.2$ (de tipo N), la $\omega\text{-CgTx}$ ($1\mu\text{M}$). Este péptido redujo la corriente en un $43 \pm 2\%$ en neuronas PD14 ($n = 11$; Fig. 8G), mientras que en neuronas PD40 redujo la corriente en un $28 \pm 2\%$ ($n = 8$; Fig. 8H). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 8I; $P < 0.002$; U de Mann-Whitney); indicando que los canales de calcio de tipo N disminuyen su número y su contribución relativa a la corriente total de calcio durante la ventana de desarrollo que va de PD14 a PD40. Estos es, los canales de tipo N disminuyen y esta disminución compensa el aumento de los canales de tipo P/Q. Se han publicado

resultados algo similares en neuronas piramidales en cultivo (Chameau et al., 1999), pero esta es la primera vez que estos cambios del desarrollo postnatal se reportan en cualquier neurona del cerebro estudiada *in situ*.

Finalmente, para aislar la $ICa^{2+} Ca_v2.3$ (de tipo R) se aplicaron conjuntamente nitrendipina, ω -Aga TK y ω -CgTx; a las concentraciones anteriormente mencionadas y se midió la corriente resistente para todos estos bloqueadores. Menos del 15% de la corriente inicial es resistente en ambas etapas del desarrollo (Fig. 8 J y L), indicando que, como los canales de tipo L, los canales de tipo R no cambian su número durante este periodo. En neuronas PD14, la contribución de cada tipo de canal a la corriente total es (ver métodos y Vilchis et al., 2002) la siguiente: de tipo L, 27%; de tipo P/Q; 22%; de tipo N, 39%; de tipo R, 12% (Fig. 9A). Mientras que, en neuronas PD40 los porcentajes obtenidos son los siguientes: de tipo L, 22%, de tipo P/Q, 38%; de tipo N, 26%; de tipo R, 14% (Fig. 9B). Concluimos que la expresión de los canales de calcio de tipo N es disminuida, mientras que la de los canales de tipo P/Q incrementa durante este intervalo, aunque la corriente total permanece igual. Curiosamente, este cambio coincide con la última ola de inervación dopaminérgica que acontece cuando se da la última etapa del desarrollo motor, al pasar de la etapa PD14 a la etapa PD40.

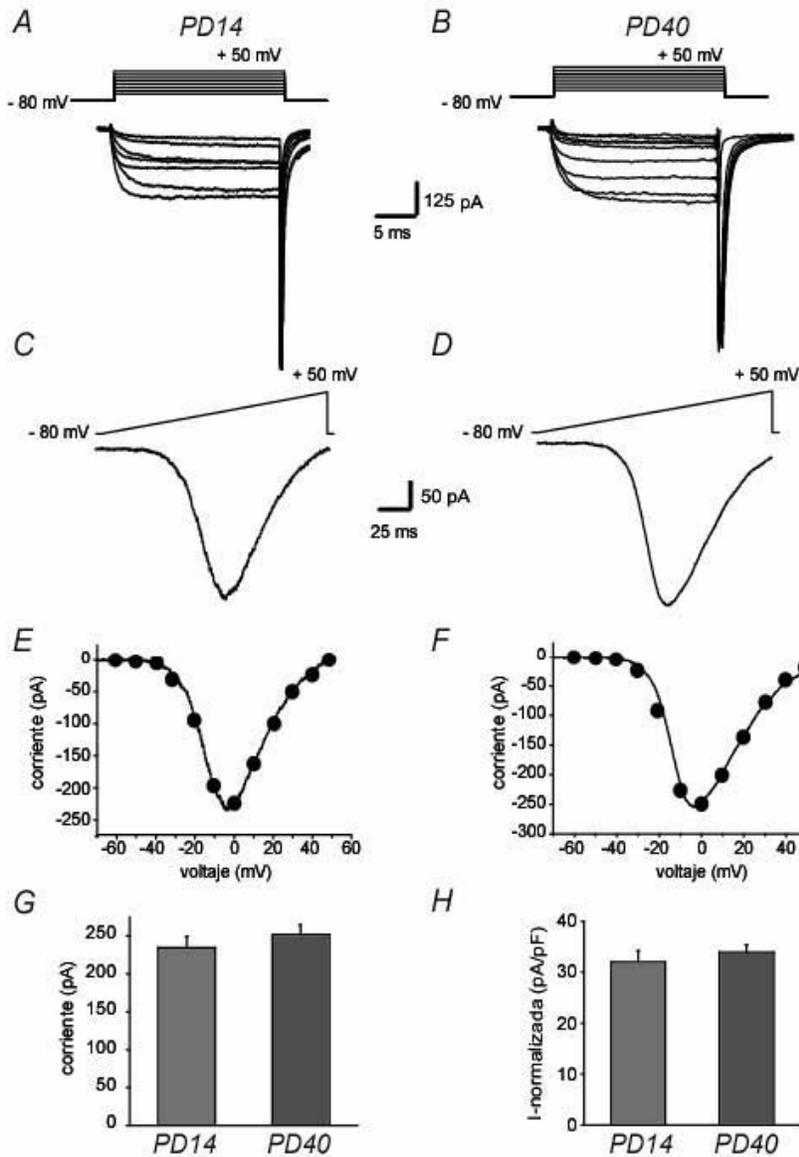


Figura 7. La densidad de $I_{Ca^{2+}}$ no cambia entre las etapas del desarrollo PD14 y PD40. A: familia de corrientes dadas en respuesta a pasos de comandos de voltaje de 20 ms de duración desde -80 a 50 mV, en pasos de 10 mV, en una célula de PD14. B: familia de corrientes obtenida con el mismo protocolo en una célula de PD40. C: corrientes obtenidas con una rampa despolarizante de -80 a 50 mV con una duración de 180 ms en PD14 (misma célula mostrada en A). D: corrientes obtenidas con el mismo protocolo de rampas en una célula de PD40 (misma célula mostrada en B). E: relación voltaje-corriente de la célula de PD14 (curva V-I) construida con corrientes obtenidas con comandos de

voltaje (círculos negros) y con rampas de voltaje (línea continua). Note que ambos protocolos coinciden. F: curva V-I de una célula de PD40 construida como en E. G: histograma que compara la amplitud de corrientes (media \pm error estándar) de neuronas de PD14 y PD40. H: el histograma muestra que la densidad de corriente obtenida por dividir la amplitud de las corrientes entre la capacitancia celular no cambia en ambas etapas. Se utilizó 5 mM de Ba^{2+} como acarreador de carga. Todos los registros se realizaron en neuronas espinosas medianas.

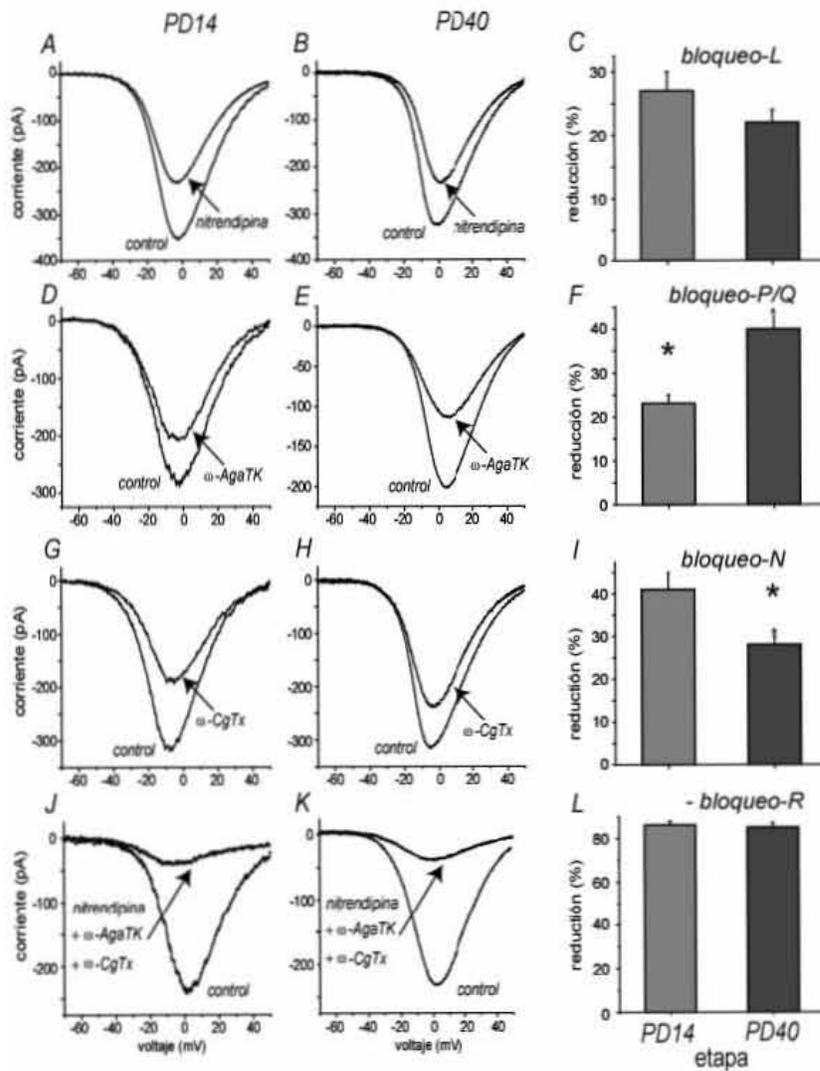


Figura 8. Los canales de calcio Cav2.1 (de tipo P/Q) incrementan su expresión, mientras que los canales Cav2.2 (de tipo N) reducen su expresión entre las etapas PD14 y PD40 del desarrollo en las neuronas neostriatales de proyección. A y B: se muestra el bloqueo de la ICa^{2+} por nitrendipina ($10 \mu M$) en PD14 y PD40, respectivamente. C: el histograma muestra que no existen diferencias significativas cuando se comparan los resultados: obtenidos en PD14 y PD40. D y E: se muestra el bloqueo de la ICa^{2+} por ω -Aga TK ($400 nM$) en PD14 y PD40. F: el histograma resume los resultados obtenidos, mostrando que existen diferencias

significativas cuando se comparan los efectos obtenidos en ambas etapas del desarrollo ($P < 0.001$). G y H: el bloqueo de la ICa^{2+} por ω -CgTx ($1 \mu M$) es significativamente diferente en PD14 y PD40. I: histograma que resume los resultados en ambas etapas del desarrollo ($P < 0.002$). J y K: cantidad de ICa^{2+} resistente ($Ca_v2.3$ o de tipo R), después de la aplicación conjunta de los tres bloqueadores de canales de calcio (nitrendipina, ω -Aga TK y ω -CgTx) en neuronas de PD14 y PD40. L: el histograma muestra que no existen diferencias significativas en la ICa^{2+} de tipo R en ambas etapas del desarrollo.

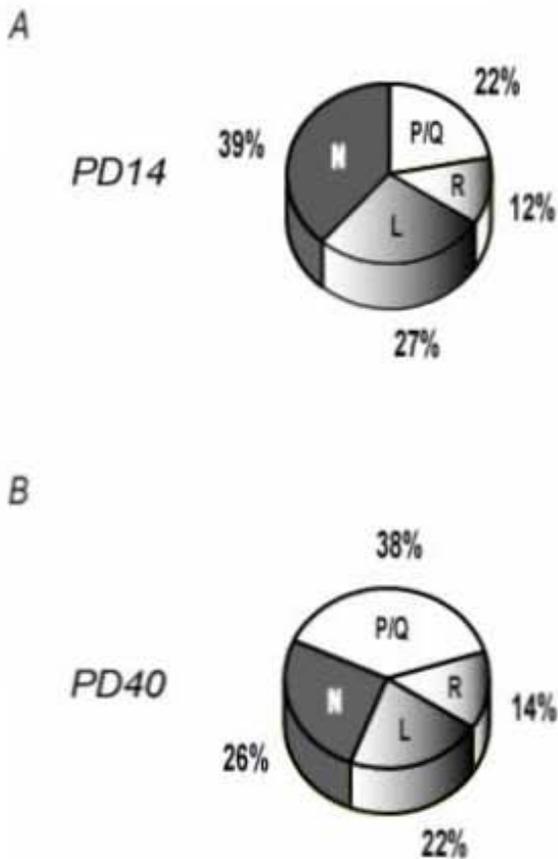


Figura 9. Contribución relativa de los diferentes tipos de canales de calcio. Los canales de calcio Ca_v 2.2 (de tipo N) disminuyen durante el desarrollo, mientras que los canales de calcio Ca_v 2.1 (de tipo P/Q) incrementan con la edad. Los canales Ca_v 1 (de tipo L) y Ca_v 2.3 (de tipo R) permanecen constantes durante el desarrollo.

4.1.2. Reasignación de los canales de calcio que median la liberación de GABA en las terminales sinápticas de las neuronas espinosas medianas.

Una función principal de los canales de calcio de tipo N y P/Q en las neuronas espinosas medianas es la de accionar la liberación del transmisor (Tecuapetla et al., 2005), debido a esto, se eligió estudiar el significado funcional de estos cambios en el desarrollo, proponiendo que la liberación de GABA de las terminales de las NEMs PD40 pudieran estar mediadas principalmente por los canales de calcio de tipo P/Q. Para probar esta hipótesis, medimos corrientes

postsinápticas inhibitorias (IPSCs) dadas en respuesta de la activación de los axones colaterales que interconectan entre sí a las neuronas espinosas medianas. Estas corrientes se obtuvieron por estimulación eléctrica del globo pálido y así activar antidrómicamente los axones estriatofugales y, por lo tanto, estimular los axones colaterales que se encuentran dentro del neostriado y que interconectan a las neuronas principales (Guzmán et al., 2003). En la etapa PD14, ambos tipos de canal, N y P/Q median la liberación de GABA de estas terminales (Fig. 10 A y D): ambas la ω -CgTx y la ω -Aga TK redujeron la amplitud de las IPSCs en un $65 \pm 7\%$ ($n = 10$) y en un $90 \pm 5\%$ ($n = 8$), respectivamente (ambos péptidos se usaron a concentraciones saturantes, $1\mu\text{M}$ y 400 nM respectivamente); mostrando superaditividad. En contraste, el efecto bloqueador de la ω -CgTx sobre las IPSCs resulto significativamente menor en PD40 comparada con PD14: la ω -CgTx redujo un solamente $18 \pm 7\%$ la amplitud de la corriente ($n = 5$; Fig. 10B; $P < 0.009$; U de Mann-Whitney; Fig. 10C). Por otro lado, el bloqueador de los canales de calcio de tipo P/Q, ω -AgaTK, bloqueo completamente la amplitud de las IPSCs en neuronas PD40: $98 \pm 1\%$ ($n = 5$; Fig. 10E). El efecto de la ω -AgaTK no es significativamente diferente cuando se comparan los efectos en ambas etapas del desarrollo (Fig. 10F; U de Mann-Whitney); y solamente se observó que la participación de los canales de calcio de tipo N en la transmisión sináptica de las neuronas espinosas medianas disminuye. Es decir, la participación de los canales de calcio de tipo P/Q se vuelve la más importante y prácticamente exclusiva para el acople excitación-secreción en las terminales adultas. Estos resultados muestran que la reconfiguración de los

canales de calcio ocurre simultáneamente en el soma y en las terminales sinápticas de las mismas neuronas (NEMs). Cambios similares se han reportaron en otras terminales sinápticas inhibitorias (Iwasaki y Takahashi, 1998; Iwasaki et al., 2000; Verdeiro et al., 1995).

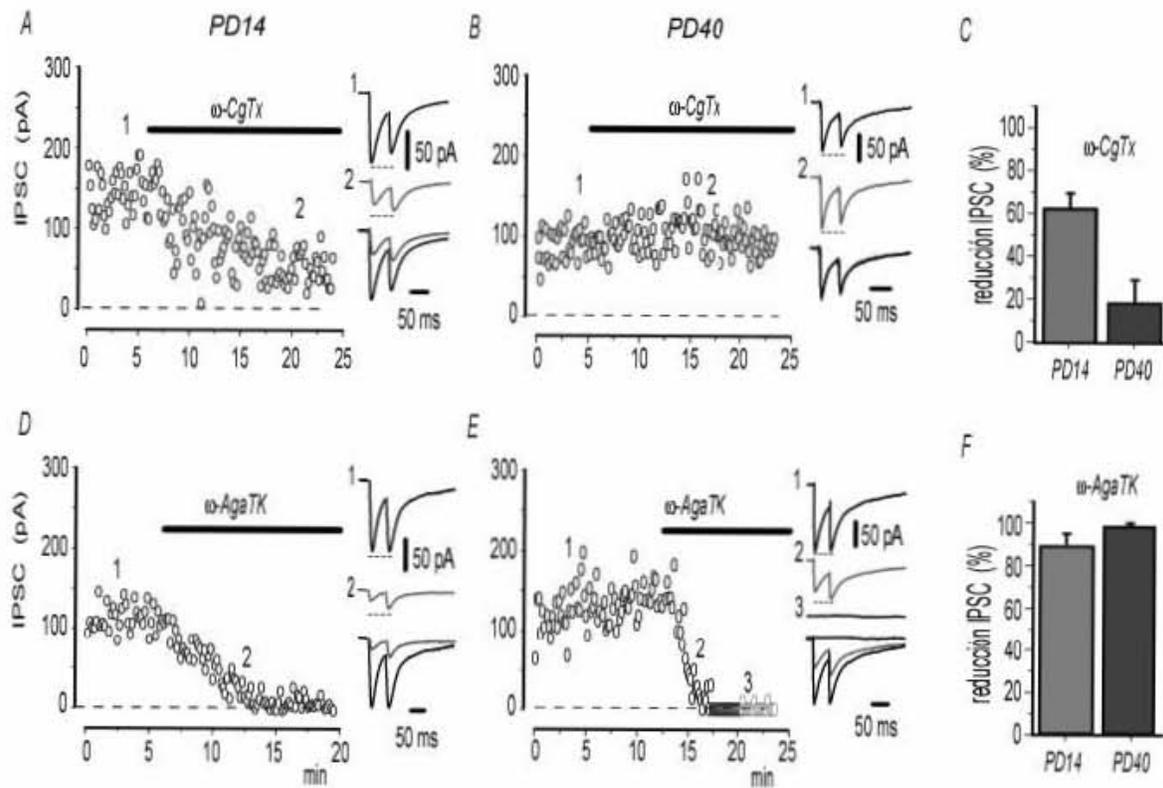


Figura 10. La sensibilidad a la ω -CgTx en las terminales sinápticas disminuye con el desarrollo. A: 1 μ M de ω -CgTx redujo mucho (\approx 65%) las corrientes postsinápticas inhibitorias en neuronas PD14 (IPSCs). Observe la transición de la depresión sináptica (de pulso pareado) en control (1 inserto) a facilitación sináptica durante la acción de la ω -CgTx (2 inserto). B: la sensibilidad de las IPCSs a la ω -CgTx se redujo grandemente en neuronas de PD40 (\approx 18%). C: el histograma muestra que el efecto producido por la ω -CgTx es significativamente diferente ($P < 0.009$). D y E: muestran la sensibilidad de las IPSCs a la ω -Aga TK en ambas etapas del desarrollo. El bloqueo de los canales de calcio de tipo P/Q incremento la relación entre los pulsos pareados (inserto). F: el histograma resume los efectos de la ω -AgaTK en PD14 y PD40 (no hay diferencias significativas).

4.1.3. Relación concentración-respuesta del agonista selectivo a la familia de los receptores D₂, quinolorane, sobre las corrientes de calcio.

En este trabajo de tesis se estudió la relación concentración-respuesta (Fig. 11A) de un agonista selectivo para la familia de receptores dopaminérgicos D₂, el quinolorane, determinándose una EC₅₀ de 513 nM, con un coeficiente de Hill que no difirió significativamente de 1. El efecto saturante se obtuvo con una concentración de 10 μM (Fig. 11B).

La aplicación del antagonista selectivo para la familia de receptores D₂, el sulpiride (1 μM), bloqueó completamente la acción de una dosis saturante del agonista (Fig. 11C).

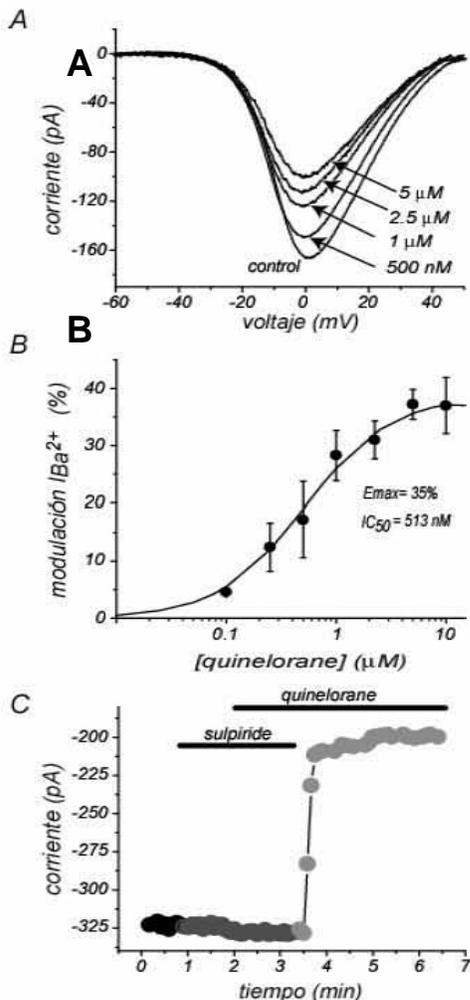


Figura 11. El agonista selectivo de la familia de receptores D₂, quinolorane, reduce la I_{Ca²⁺} en las neuronas espinosas medianas del neostriado. A. La reducción de la I_{Ca²⁺} es dependiente de la concentración (experimento representativo). B. La curva concentración respuesta se obtuvo normalizando los datos de n = 43 neuronas: EC₅₀ = 513 nM; nH = 1.1; E_{max} = 35%. C. La modulación provocada por el quinolorane (10 μM) pudo ser totalmente bloqueada por el antagonista selectivo sulpiride (1 μM). El curso temporal de la acción D₂ (círculos) se obtuvo graficando la amplitud de la corriente contra el tiempo después de obtener una amplitud estable en el control (círculos negros). Las barras horizontales indican los momentos de aplicación del antagonista (círculos gris oscuro) y el agonista (círculos gris claro). Note que la adición del agonista no tiene efecto mientras el antagonista está en la perfusión.

4.1.4. Modulación de las corrientes de calcio por el receptor dopaminérgico D₂ en neuronas de PD14 y PD40

La activación de los receptores dopaminérgicos modula corrientes de calcio en las NEMs. Solo la modulación de los canales de calcio de tipo L ha sido estudiada extensamente (Hernández-López et al., 2000; Olson et al., 2005; Rakhilin et al., 2004). La figura 12 confirma la modulación de la I_{Ca²⁺} en las neuronas espinosas medianas, en ella se muestra que la modulación por el agonista quinolorane es reversible durante el curso temporal de un experimento típico. La modulación de la I_{Ca²⁺} se observó en el 80% de las neuronas registradas en ambas etapas del desarrollo.

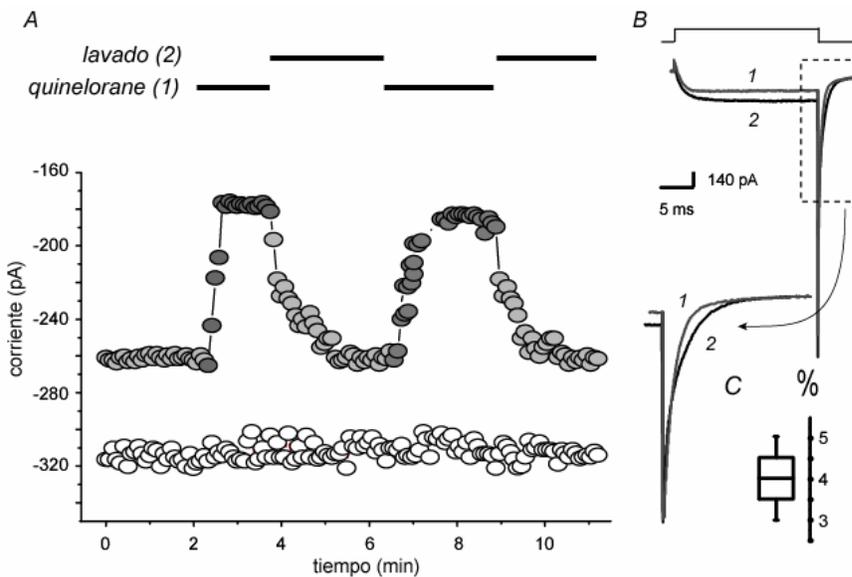


Figura 12. La activación de los receptores dopaminérgicos D₂ modula reversiblemente las corrientes de Ca²⁺. A: se muestra el curso temporal del efecto de dos aplicaciones sucesivas de quinolorane (10 μM) sobre la I_{Ca²⁺}. También se muestra que la modulación de la I_{Ca²⁺} fue reversible.

Las barras indican el tiempo de aplicación y de lavado del quinolorane. La estabilidad de la I_{Ca²⁺} cuando no se aplico ningún fármaco se observa en círculos claros (trazos tomados de otra neurona). B: registros representativos del experimento mostrado en A: note que la amplitud de la corriente en el estado estable y la amplitud de la cola lenta de corriente son disminuidas por el agonista D₂. C: diagrama de caja mostrando el porcentaje de reducción de la corriente cuando no se aplico ningún fármaco en una neurona de PD40 (n=15). Resultados similares se obtuvieron en neuronas de PD14.

La figura 13 A y B, muestra que la modulación de la ICa^{2+} por activación de los receptores D_2 se presentó en ambas etapas del desarrollo (PD14 y PD40). Esta modulación no varió significativamente entre estas dos etapas (Fig. 13 C). 10 μ M de quinolorane redujo la corriente en un $35 \pm 2\%$ en PD14; mientras que en neuronas de PD40 inhibió un $36 \pm 3\%$ ($n=12$; diferencia no significativa; U de Mann-Whitney). La modulación de la ICa^{2+} por activación de los receptores dopaminérgicos no solo reside en la membrana somatodendrítica, sino que también se presentó en las terminales sinápticas. La figura 13D y E muestra que la modulación de la liberación de GABA por la activación de los receptores dopaminérgicos D_2 en las terminales sinápticas de las NEMs estuvo presente en las etapas PD14 y PD40. La aplicación de quinolorane 1 μ M redujo la amplitud de las IPSCs en ambos casos: $50 \pm 8\%$ en PD14 ($n=12$) y $42 \pm 5\%$ en PD40 ($n=6$; Fig. 13F). Por lo tanto, la modulación dopaminérgica de los axones colaterales que interconectan a las neuronas espinosas medianas está presente durante todo el desarrollo postnatal hasta llegar a la edad adulta. Esta respuesta se observó en todas las células registradas en PD40 ($n=6$) y no se observó en 2 de 12 células registradas en PD14 (17%), sugiriendo que no todas las terminales poseen receptores dopaminérgicos D_2 .

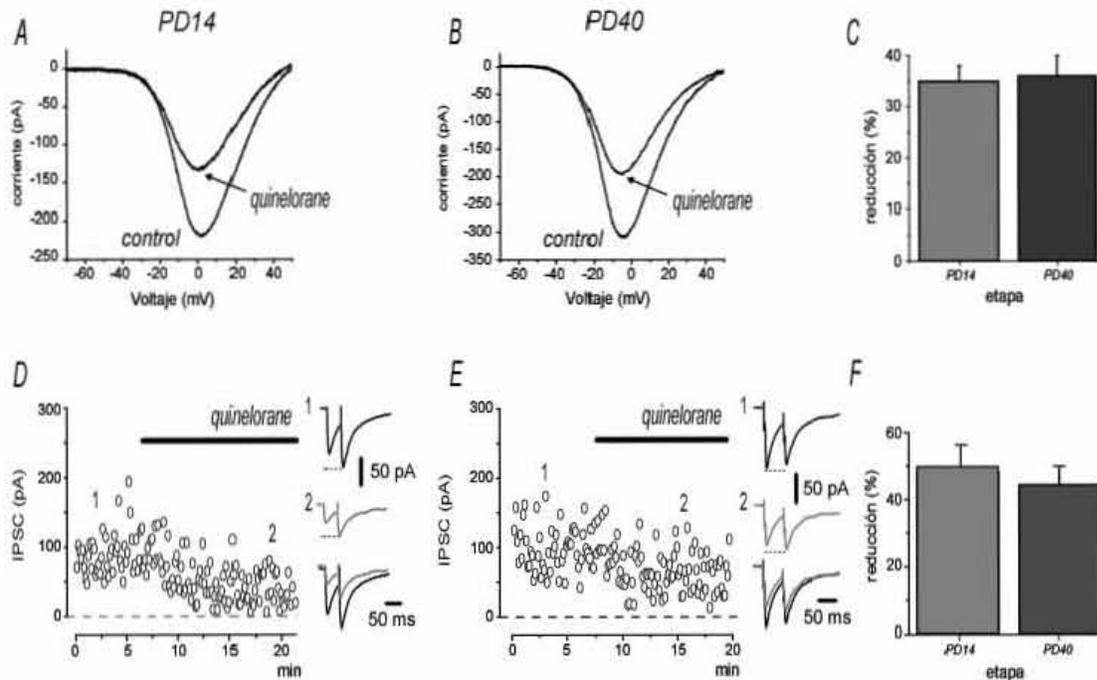


Figura 13. La modulación de la $I_{Ca^{2+}}$ por el receptor dopaminérgico D_2 fue la misma en PD14 y PD40. A y B: reducción de la $I_{Ca^{2+}}$ producida por la aplicación de quinlorane $10 \mu\text{M}$ en PD14 y PD40. C: el histograma resume los resultados obtenidos en PD14 y PD40 (no significativamente diferentes). D y E: la reducción de las IPSCs por el agonista de los receptores D_2 (el quinlorane $1 \mu\text{M}$) no difiere significativamente en las terminales sinápticas de las neuronas neostriatales en ambas etapas del desarrollo. Note que la relación entre las respuestas a los pulsos pareados incrementó con la acción de los receptores D_2 en ambos casos. F: el histograma resume los resultados obtenidos en PD14 y PD40 (no hay diferencias significativas).

Se ha reportado que el valor de la proporción entre las respuestas sinápticas a los pulsos pareados (tasa entre pulsos pareados o TPP) es linealmente proporcional a la probabilidad de liberación, por lo que este protocolo de estimulación es ampliamente aceptado como el protocolo ideal para investigar las acciones presinápticas de los receptores (Baldelli et al., 2005). En las NEMs PD14 la TPP de las IPSCs después de un estímulo apareado (figuras 13D) es de 1.3 ± 0.16 en condiciones control y en presencia del agonista del receptor D_2 se

incrementó a 1.9 ± 0.26 ($n=12$; $P < 0.002$; T de Wilcoxon). En PD40 la TPP que se obtuvo es de 0.82 ± 0.1 en condiciones control y en presencia del agonista del receptor D_2 es de 0.97 ± 0.08 ($n=16$; $P < 0.05$; T de Wilcoxon). Indicando que la modulación por los receptores D_2 es presináptica en ambas etapas del desarrollo. Sin embargo, para apoyar esta inferencia, se realizó un análisis de la varianza vs la media (Clements y Silver, 2000), acompañado de un análisis independiente de los histogramas de amplitud de las respuestas. La figura 14A muestra un histograma de amplitudes de IPSCs espontáneas registradas en una neurona neostriatal (Fig. 14B). Estos eventos pueden provenir de interneuronas o de terminales de neuronas espinosas y son ajustados a una función Gaussiana con una primera amplitud modal de 8 pA (rango de 5-12 pA), similar a lo reportado para otras sinapsis GABAérgicas (Ling y Benardo, 1999). La segunda amplitud modal obtenida es de 16 pA (rango de 12-20 pA). Posteriormente, las IPSCs se indujeron mediante la aplicación de pulsos con estimulación mínima. El histograma de amplitud de estas IPSCs es multimodal (Fig. 14C y D), obteniendo valores de 9 y 17 pA para las primeras dos amplitudes modales en este caso, el intervalo entre picos es de 8 a 9 pA (Ling y Benardo, 1999). La semejanza entre las modas de los histogramas de las IPSCs espontáneas e inducidas apoya la noción de que las terminales que interconectan neuronas espinosas son bastante homogéneas. (Tecuapetla et al., 2005), y sus valores modales se pueden utilizar para tener un aproximado del valor del cuanto de liberación independiente al del análisis cuántico proporcionado por la función varianza vs la media (Clements y Silver, 2000). De las IPSCs inducidas se obtuvo un rango de amplitudes de

diferentes experimentos (ver gráfica de intensidad-amplitud en Tecuapetla et al. 2005). Las amplitudes medias de las IPSCs se graficaron contra su varianza (Fig. 14E, círculos negros) y la gráfica resultante se ajustó a una parábola (ver Clements y Silver, 2000), dando una amplitud cuántica promedio de: $Q_w = 8 \pm 2$ pA, notablemente similar a la amplitud de la primer respuesta modal de los histogramas de las figuras 7A y C. Por otro lado, en presencia del agonista de los receptores D_2 , quinolorane ($1\mu\text{M}$), el Q_w que se obtuvo fue 9 ± 2 , que no fue significativamente diferente de las condiciones control (U de Mann Whitney). Como la pendiente inicial de la parábola no sufrió cambios en presencia del agonista quinolorane; el análisis cuántico de la varianza contra la media apoya que las acciones del receptor dopaminérgico D_2 son puramente presinápticas (ver Clements y Silver, 2000).

Dado que la amplitud máxima de las IPSCs en presencia del agonista del receptor D_2 no permitió un ajuste confiable de la parábola varianza vs. media, no se pudo determinar si las acciones de los receptores D_2 provocaron una reducción de la probabilidad de liberación (P_w) o una reducción en el número de sitios activos (N) (ver Clements y Silver, 2000). Sin embargo, la figura 14F sugiere directamente que la acción de los receptores D_2 puede ser en parte resultado de un decremento en P_w , aunque una disminución en el número de sitios no puede ser descartada. Una P relativa puede ser obtenida directamente por el número de IPSCs registradas sobre el número total de ensayos (en la primer respuesta; Fig. 14F); en donde P se reduce de 0.6 en condiciones control a < 0.1 en presencia del quinolorane. El promedio de ensayos individuales demuestra un aumento en

TPP en presencia del quinolorane (Fig. 14F). En resumen, ambos: los cambios en TPP y el análisis cuántico mediante la función varianza-media, indicaron que las acciones de los receptores dopaminérgicos D₂ son presinápticas. Por otro lado, estos cambios nunca se acompañaron de un cambio en la resistencia de entrada de la célula postsináptica o un cambio en los índices de forma (*shape indexes*) de las IPSCs.

Las acciones mediadas por los receptores de la familia D₂ sobre los canales de calcio de deben a la activación de una cascada de señalización intracelular que inicia con la activación de la fosfolipasa C (PLC), la movilización de calcio intracelular debido al incremento en el IP₃, y la posterior activación de la enzima calcio-calmodulina (Ca-CaM). Esta última activa a la fosfatasa calcineurina que desfosforila a los canales y por lo tanto reduce la conductancia de los mismos (Hernández-López et al., 2000; Hu et al., 2005; Rakhilin et al., 2005).

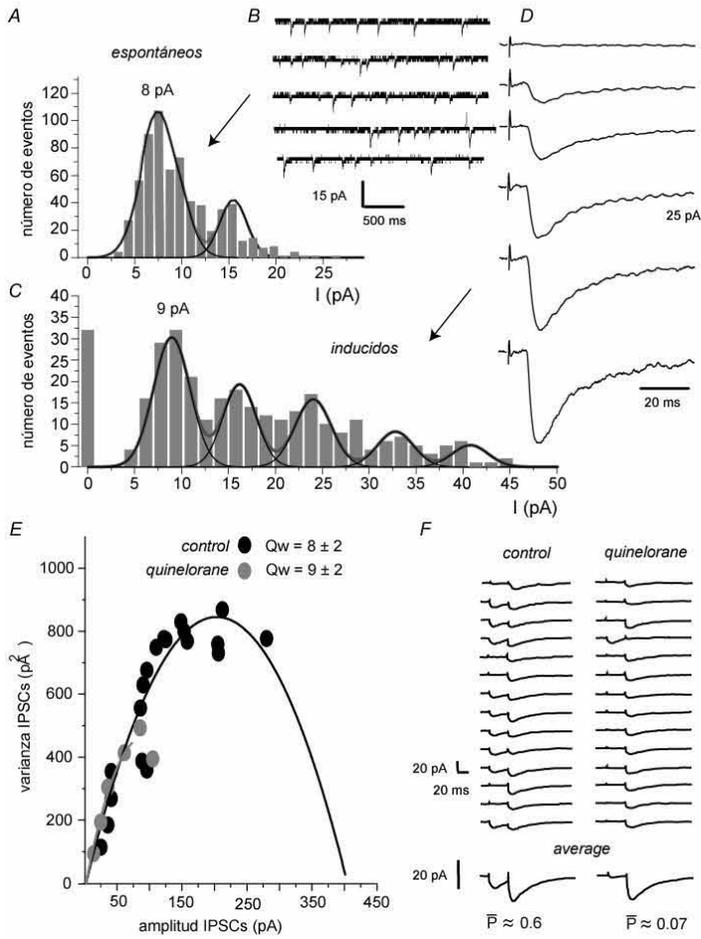


Figura 14. El análisis cuántico indica que la acción de los receptores D_2 sobre la transmisión sináptica es presináptica. A: histograma de amplitudes de IPSCs espontáneas registradas en una neurona neostriatal. Dos amplitudes modales son evidentes: 8 y 16 pA. B: ejemplo de los registros de los cuales se construyó el histograma mostrado en A. C: histograma de amplitudes de IPSCs inducidas en la misma neurona neostriatal. En este caso, las dos primeras amplitudes modales son de 9 y 17 pA, respectivamente. Obteniendo un intervalo entre las amplitudes modales de 8-9 pA. Las IPSCs se indujeron estimulando antidrómicamente los axones estriatofugales para activar los

axones colaterales que interconectan a las neuronas espinosas. D: ejemplo de registros de cada amplitud modal, incluyendo fallas. E: amplitudes al pico de las IPSCs tomadas de diferentes experimentos en los cuales se usó diferentes intensidades de estimulación. Se graficaron contra su correspondiente varianza al pico (círculos negros). Estos datos se ajustaron con una parábola de cuyos parámetros se obtiene la amplitud del cuanto = 8 pA. Es muy similar al obtenido con los histogramas A y C. En círculos grises se muestra las amplitudes de las IPSCs al pico, registradas en presencia de quinlorane ($1 \mu\text{M}$). $Q_w = 9 \text{ pA}$ (NS). F: IPSCs inducidas por estimulación mínima. Observe que en condiciones control se obtuvieron pocas fallas en la primera respuesta, y mucho mas fallas en presencia del quinlorane, sugiriendo que la probabilidad de liberación (P) es reducida. Observe que esto resulta en un aumento de la TPP incrementa, mientras que la P se reduce.

En las figuras 15 A-D se muestra que el porcentaje de modulación de las corrientes de calcio mediada por los receptores D₂ no es significativamente diferente cuando las neuronas se perfundieron internamente con 1 o 10 mM de EGTA: 34 ± 2% y 36 ± 3% respectivamente (n=6; U de Mann-Whitney). Sin embargo, las acciones mediadas por los receptores D₂ se abolen completamente cuando las neuronas se perfunden intracelularmente con 15 mM de BAPTA (Fig. 15 C y D). Lo que corrobora que las acciones de los receptores D₂ son mediadas por una vía de señalización intracelular que depende de calcio intracelular. La figura 15 F muestra una I_{Ca²⁺} obtenida en respuesta a un protocolo de doble pulso (representado en la Fig. 15 E) antes y después de la aplicación de quinolorane en una neurona de PD14, observándose que la cantidad de corriente modulada por el agonista del receptor D₂ no cambia significativamente (Fig. 15 H; T de Wilcoxon). Los mismos resultados se encontraron para neuronas PD40 (Fig. 15G y I). Estos resultados sugieren que la vía de señalización intracelular usada por los receptores D₂ para modular los canales de calcio Cav2 es una cascada dependiente de Ca²⁺ intracelular, como es el caso para los canales de calcio Ca_v1 y no se debe a vías delimitadas a la membrana o activación directa de la proteína G sobre el canal. La siguiente pregunta que abordamos fue la de si esta modulación mediada por los receptores D₂ es a través de los mismos canales de calcio en ambas etapas del desarrollo.

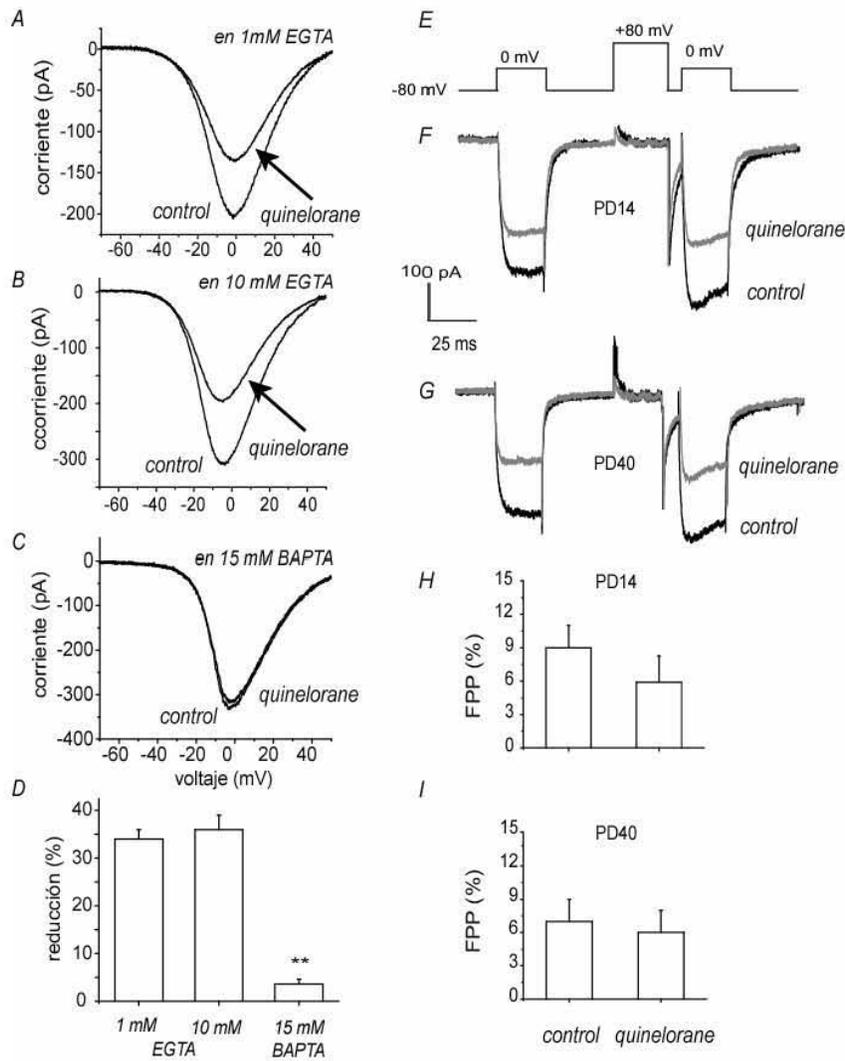


Figura 15. Las acciones de los receptores dopaminérgicos D_2 son mediadas por una vía de señalización intracelular dependiente de calcio. A: el agonista de los receptores D_2 reduce la ICa^{2+} en presencia de 1 mM de EGTA. D: el agonista de los receptores D_2 reduce la ICa^{2+} en presencia de 10 mM de EGTA. C: la acción del quinlorane sobre la ICa^{2+} se bloquea completamente en presencia de 15 mM de BAPTA; sugiriendo que estas acciones son mediadas por una vía de señalización dependiente de

calcio. D: el histograma resume los resultados. Se encontraron diferencias significativas cuando se comparo las acciones del quinlorane en presencia de EGTA y BAPTA ($P < 0.001$; ANOVA post hoc Tuckey). E: protocolo de doble pulso a 0 mV. Note que el segundo pulso es precedido por un comando despolarizante a 80 mV. F: corriente obtenida después de comandos despolarizantes a 0 mV antes y después del prepulso despolarizante a 80 mV. Note que la corriente obtenida en condiciones control (trazo negro) y en presencia de quinlorane (trazo gris) se incrementaron en la misma proporción, indicando que existe una modulación dependiente de voltaje constitutiva y que el quinlorane no la modifica significativamente en neuronas PD14. G: resultados similares se obtuvieron en neuronas PD40. H e I: el histograma resume los resultados de los experimentos mostrados en F y G ($n = 6$), respectivamente.

Dado que la modulación de las corrientes de calcio por los receptores D_2 es la misma en etapas PD14 y PD40, usamos diferentes bloqueadores de canales de calcio conjuntamente con el agonista de los receptores D_2 , el quinelorane $10 \mu\text{M}$, para determinar si los canales modulados son los mismos en ambas etapas del desarrollo. Con el fin de conocer si un determinado canal de calcio es modulado por los receptores dopaminérgicos D_2 se usaron los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} a concentraciones saturantes: nitrendipina ($10 \mu\text{M}$), ω -Aga TK (400 nM), y ω -CgTx ($1 \mu\text{M}$). Si un tipo de canal es modulado por el receptor D_2 , su bloqueo previo debe de ocluir una parte de dicha modulación. En la etapa PD14, el pretratamiento con nitrendipina no bloqueó completamente la acción del quinelorane pero la redujo (oclusión parcial) de 35 ± 2 a $26 \pm 2\%$ ($n = 11$; Fig. 16A; un 9% de oclusión; $P < 0.05$; ANOVA con post hoc Tukey). Estos resultados sugieren que la activación del receptor D_2 modula canales de calcio de tipo L en esta etapa, pero también muestra que mucho de la modulación es sobre los canales de calcio Ca_v2 . En contraste, en neuronas PD40 se observó una importante oclusión del efecto del agonista del receptor D_2 cuando primero se bloquearon los canales de Ca^{2+} de tipo L: la acción del quinelorane se redujo de 36 ± 3 a $17 \pm 1\%$ ($n = 11$; Fig. 16B; 19% de oclusión; $P < 0.0001$; ANOVA con post hoc Tukey). Estos experimentos muestran que la acción dopaminérgica D_2 de los canales de Ca^{2+} de tipo L no sólo se preserva si no que se incrementa significativamente con la edad. Lo que sugiere que la modulación dopaminérgica de la tasa de disparo incrementa su importancia con la maduración (Pérez-Garcí et al., 2003).

La modulación de los canales de calcio de tipo P/Q en presencia de ω -AgaTK en PD14 no fue ocluida significativamente: de 35 ± 2 a $27 \pm 2\%$ ($n=6$; Fig.16C, $P < 0.3$; ANOVA post hoc Tuckey). Mientras que, en neuronas PD40, la ω -AgaTK ocluyó significativamente el efecto del agonista D_2 : la acción del quinolorane se redujo de 36 ± 3 a $20 \pm 1\%$ ($n=6$; Fig. 16D; 16% de oclusión; $P < 0.0001$; ANOVA post hoc Tuckey). Esto muestra que la modulación de los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q por activación de los receptores D_2 es pequeña en PD14 pero adquiere gran importancia en PD40. Por el contrario, en presencia del bloqueador de los canales de calcio de tipo N (ω -CgTx), la acción del agonista de los receptores D_2 sobre la ICa^{2+} en neuronas de PD14 se redujo de un 35 ± 2 a $12 \pm 2\%$ ($n = 8$; Fig. 16E; 23% de oclusión; $P < 0.0001$; ANOVA post hoc Tuckey). Así, la ω -CgTx resultó ser el bloqueador de canales de calcio mas potente en ocluir la modulación dopaminérgica D_2 en la etapa PD14. Esto sugiere que la modulación de los canales de calcio de tipo N por los receptores D_2 es más importante que la modulación de los canales de calcio de tipo L en esta etapa del desarrollo. En contraste, la ω -CgTx no ocluyó significativamente la acción del quinolorane sobre la ICa^{2+} en neuronas PD40. La reducción de la ICa^{2+} por el quinolorane en presencia de ω -CgTx en neuronas PD40 fue de 36 ± 3 a $31 \pm 3\%$ ($n=8$; Fig. 16F; $P < 0.9$; ANOVA Tuckey). Estos resultados indican que la modulación de los canales de calcio de tipo N por la activación de los receptores D_2 es muy importante en PD14; pero casi nula en neuronas PD40.

Un resumen de estos resultados es mostrado en la figura 17, donde se observa que el más potente bloqueador de la acción de los receptores D_2 en neuronas PD14 es la ω -CgTx, seguida por la nitrendipina. Sin embargo, en neuronas PD40, ambas nitrendipina y ω -AgaTK son los bloqueadores más potentes de la acción de los receptores D_2 sobre las corrientes de calcio. Resumiendo, un cambio de blanco para la modulación ejercida por el receptor de la familia D_2 ocurre en las NEMs durante el desarrollo postnatal desde la infancia hasta la etapa adulta; durante el desarrollo de las capacidades motoras.

Los porcentajes de modulación, así como los porcentajes de bloqueo por las toxinas, se introdujeron a un sistema lineal de ecuaciones simultáneas (ver Vilchis et al. 2002) para saber los porcentajes de modulación dopaminérgica para cada tipo de canal de calcio. Para explicar el 35% de modulación dopaminérgica sobre la corriente total en neuronas PD14, el sistema de ecuaciones arrojó: $0.35 = L (0.25) + P/Q (0.17) + N (0.63) + R (0)$, donde los coeficientes L, P/Q, N y R denotan el porcentaje con el que cada tipo de canal contribuye a la ICa^{2+} total (bloqueo por toxinas) (ver Fig. 9A). El mismo sistema de ecuaciones se aplicó a neuronas PD40 para explicar el 36% de modulación dopaminérgica: $0.36 = L (0.81) + P/Q (0.45) + N (0.04) + R (0)$ (ver Fig. 9B). Este análisis arrojó resultados cuantitativos e indica: 1) que la modulación del canal de tipo L por el receptor D_2 incrementa durante el desarrollo de 25 a 81%, siendo esta modulación la de mayor importancia al llegar a la edad adulta, 2) la modulación del canal de tipo P/Q incrementa durante el desarrollo hasta llegar al 45%, siendo el segundo canal más importante que es modulado por los receptores dopaminérgicos de la familia

D₂, 3) los canales de calcio de tipo N los más importantemente modulados, hasta en un 63%, en neuronas PD14 (etapa infantil). Sin embargo, la modulación de los canales de tipo N tiende a desaparecer con la edad.

Si nuestros resultados son correctos, las siguientes predicciones deben de corroborarlos: Primero, la administración conjunta de nitrendipina 10 μM y ω-AgaTK 400 nM debe de bloquear de manera casi completa la acción del quinelorane en neuronas PD40 pero no PD14 (Fig. 18 A y B). Por el contrario, la administración conjunta de nitrendipina 10 μM y ω-CgTx 1 μM debe de bloquear la acción del agonista del receptor D₂ en neuronas PD14, pero no en neuronas PD40 (Fig. 18 D y E).

La figura 18 ilustra que después del bloqueo de los canales de calcio de tipo L y P/Q, el quinelorane ya no tiene prácticamente efecto en neuronas PD40: $3 \pm 1\%$ (n = 6; Figs. 18B, C), mientras que en neuronas PD14 la modulación remanente es del $19 \pm 1\%$ en PD14 (n = 6; Figs. 18A, C). La diferencia entre edades fue significativa (Fig. 18C; $P < 0.0001$; ANOVA post hoc Tuckey). Cuando los canales de calcio bloqueados fueron los tipos L y N la acción del quinelorane se abatió en neuronas PD14 a un $6 \pm 0.7\%$ (n = 6; Figs. 18 D y F). En las mismas condiciones el agonista de los receptores D₂ siguió modulando la corriente en un $18 \pm 2\%$ (n = 6; Fig. 18 E y F). La diferencia entre edades fue significativa (Fig. 18 F; $P < 0.0001$; ANOVA post hoc Tuckey).

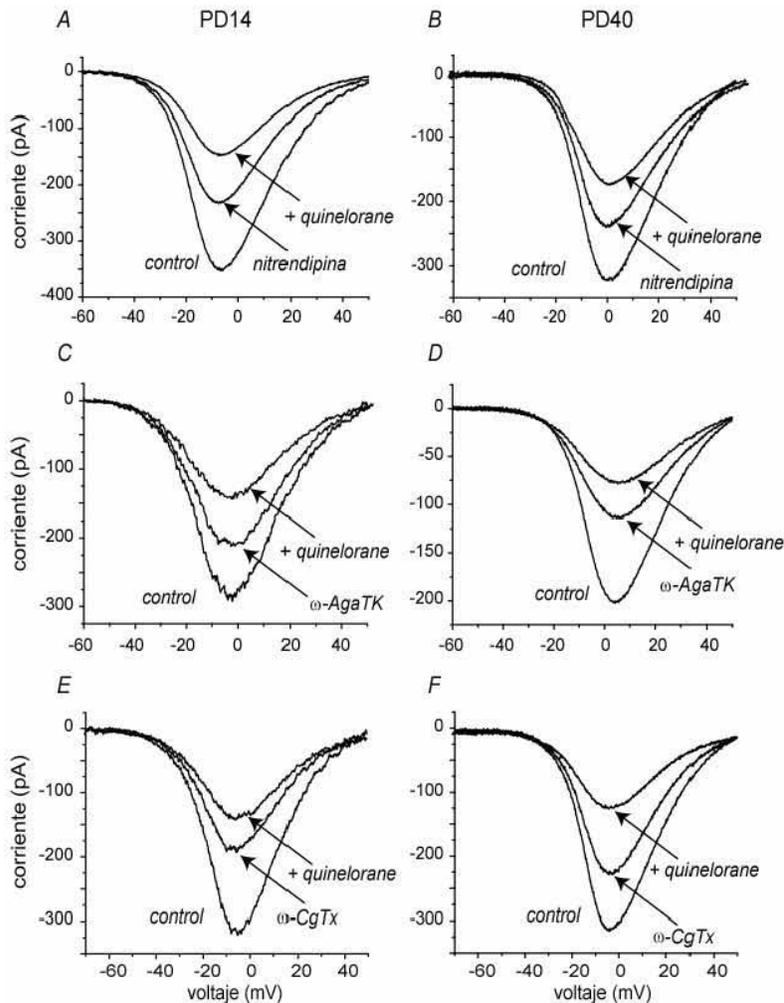


Figura 16. Corrientes de calcio moduladas por activación de los receptores D_2 durante el desarrollo. A: el bloqueo previo de los canales de Ca^{2+} de tipo L por nitrendipina ($10 \mu M$) en neuronas PD14 no impide la acción del agonista de los receptores D_2 , quinelorane ($10 \mu M$), sobre las corrientes de calcio, indicando una importante modulación de los canales de calcio Ca_v2 . Sin embargo, hubo oclusión parcial de la modulación durante esta etapa. B: DE manera similar, el bloqueo de los canales de Ca^{2+} de tipo L ocluyó parcialmente la acción del quinelorane sobre las corrientes de Ca^{2+} en neuronas PD40. Esta

occlusión fue significativamente mayor en neuronas PD40 ($P < 0.04$). C: En neuronas PD14, el quinelorane actuó sobre la ICa^{2+} después de bloquear los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q con ω -Aga TK (400 nM). La acción del agonista de los receptores D_2 no es significativamente diferente con o sin ω -Aga TK. D: La ω -Aga TK ocluyó significativamente la acción del quinelorane sobre la ICa^{2+} en neuronas de PD40. La oclusión de la acción de los receptores D_2 por la ω -Aga TK es significativamente diferente cuando se comparan ambas etapas del desarrollo ($P < 0.05$). E: la acción del quinelorane sobre la ICa^{2+} en neuronas PD14 se redujo mucho después del bloqueo de los canales de Ca^{2+} de tipo N con ω -CgTx ($1 \mu M$). F: la ω -CgTx no ocluyó la acción del quinelorane sobre las corrientes de Ca^{2+} en neuronas PD40. La oclusión de la acción de los receptores D_2 por la ω -CgTx es significativamente diferente cuando se comparan ambas etapas del desarrollo ($P < 0.001$).

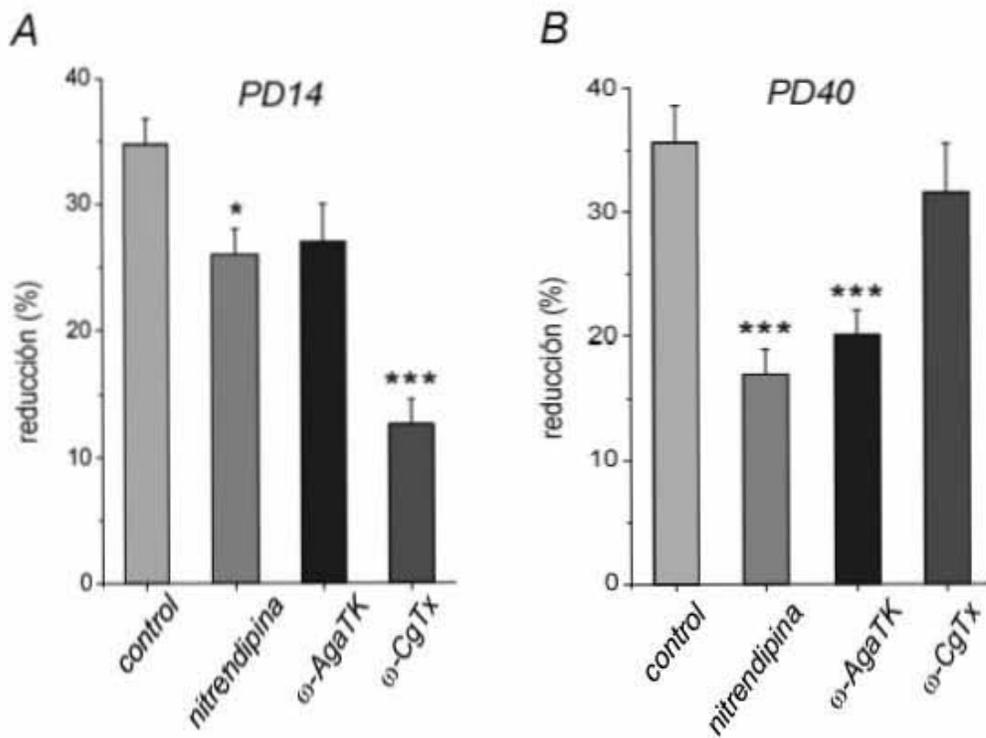


Figura 17. Acción de los receptores dopaminérgicos D_2 sobre los diferentes componentes de la $I_{Ca^{2+}}$. A: el bloqueador mas potente de la acción dopaminérgica D_2 sobre la $I_{Ca^{2+}}$ total en neuronas PD14 es la ω -CgTx ($P < 0.0001$), indicando que la modulación dopaminérgica de los canales de calcio de tipo N es muy importante en etapas tempranas del desarrollo. La modulación de los canales de calcio de tipo L también estuvo presente en esta etapa ($P < 0.05$). B: la modulación de los canales de calcio de tipo L y P/Q se vuelve muy importante con la maduración neuronal ($P < 0.0001$). Sin embargo, la modulación de los canales de calcio de tipo N, prácticamente desaparece.

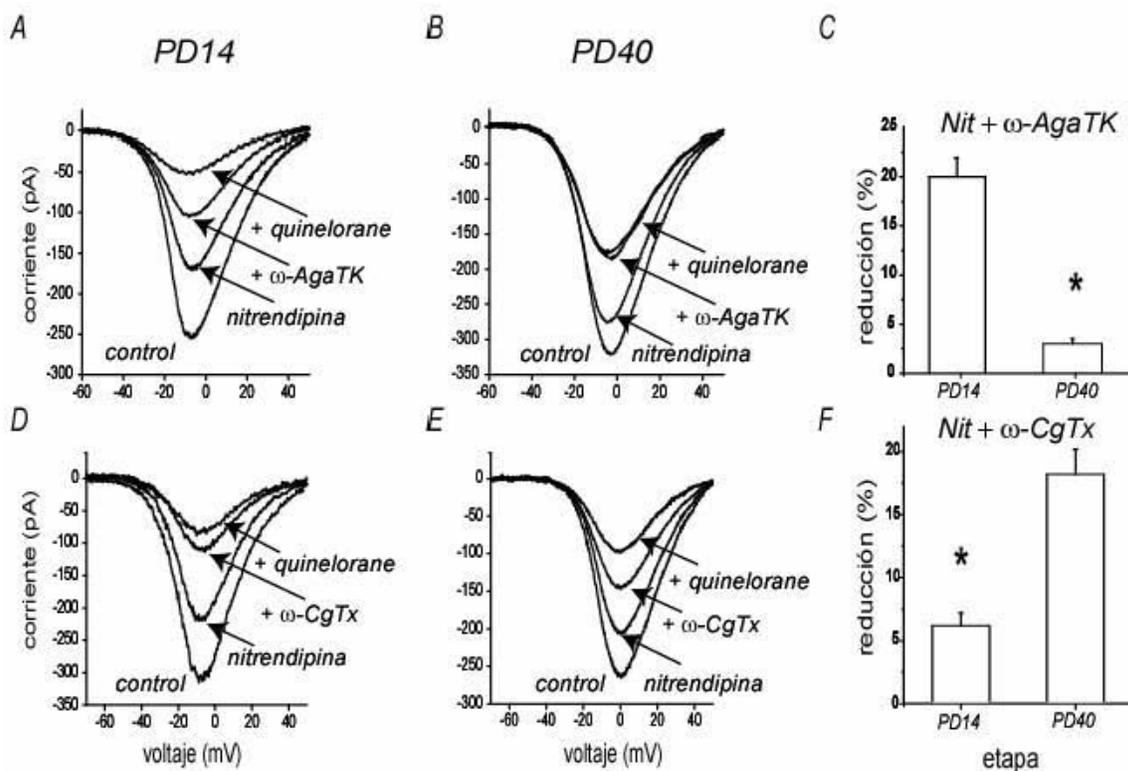


Figura 18. Diferentes pares de canales de calcio explican la modulación dopaminérgica D₂ de las corrientes de calcio en neuronas infantiles y adultas. A: el agonista de los receptores de la familia D₂, el quinolorane (10 μM), todavía tiene una acción substancial sobre la I_{Ca}²⁺ en neuronas PD14 después del bloqueo de los canales de calcio de tipo L y P/Q. B: Sin embargo, la acción del quinolorane sobre las corrientes de calcio en neuronas PD40 casi se abolió después del bloqueo de los mismos. C: El histograma resume las acciones del quinolorane sobre las corrientes de calcio en neuronas de PD14 y PD40 en presencia del bloqueo de los canales de Ca²⁺ L y P/Q (P < 0.0001). D: La acción del agonista de los receptores D₂ se abatió después del bloqueo de los canales de calcio de tipo L y N en neuronas PD14. E: El agonista de los receptores D₂ todavía tiene una acción substancial sobre la I_{Ca}²⁺ en neuronas PD40 después del bloqueo de los canales de calcio de tipo L y N. F: El histograma resume las acciones del quinolorane sobre las corrientes de calcio en neuronas de PD14 y PD40 en presencia del bloqueo de los canales de calcio L y N (P < 0.0001).

4.1.5. El cambio de blanco en la señalización dopaminérgica también se refleja en las terminales sinápticas

Para estudiar si este cambio de blanco en la modulación dopaminérgica D_2 (del canal de tipo N al P/Q) afecta la modulación presináptica que regula la liberación del neurotransmisor, el efecto del agonista de la familia del receptor D_2 , quinolorane ($1\mu\text{M}$), se examinó en presencia de $\omega\text{-CgTx}$ ($1\mu\text{M}$) sobre las IPSCs generadas por activación antidrómica de los axones colaterales. La figura 19A muestra que la $\omega\text{-CgTx}$ abolió la mayor parte de la reducción mediada por los receptores D_2 de las IPSCs en terminales sinápticas de neuronas PD14: de $50 \pm 8\%$ en condiciones control a solo $10 \pm 2\%$ en presencia de $\omega\text{-CgTx}$ ($n = 3$; Fig. 19A; $P < 0.02$; U de Mann-Whitney). La posterior aplicación de $\omega\text{-Aga TK}$ bloqueó las corriente sináptica remanente (Fig. 19A); confirmando que los canales de calcio de tipo P/Q están presentes en las terminales sinápticas, pero que el quinolorane tiene su mayor acción sobre los canales de calcio de tipo N en etapas infantiles. Como contraste, la $\omega\text{-CgTx}$ no impide la acción del agonista D_2 en terminales de neuronas PD40. La reducción de las IPSCs en condiciones control fue de $42 \pm 5\%$ y $40 \pm 8\%$ en presencia de la $\omega\text{-CgTx}$ ($n = 5$; Fig. 19B; la diferencia no fue significativa; U de Mann-Whitney). Esto muestra que los canales de calcio de tipo N no son el blanco de la modulación por los receptores D_2 presinápticos en edad adulta. Así, la modulación dopaminérgica esta presente en las terminales sinápticas de las NEMs en ambas etapas del desarrollo pero es mediada por un tipo de canal de calcio diferente en cada edad.

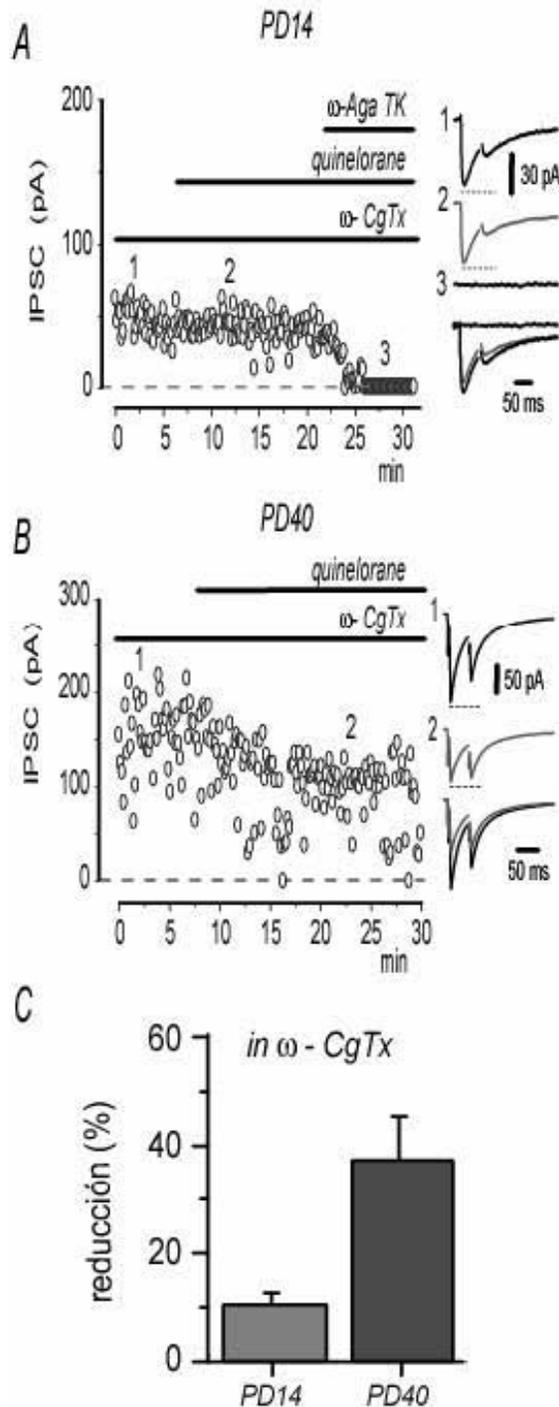


Figura 19. La modulación presináptica mediada por los receptores D₂ es ocluida por el bloqueo de los canales de calcio de tipo N en neuronas PD14 pero no en neuronas PD40. A: curso temporal de la amplitud de las IPSCs registradas en presencia de 1 μM de ω-CgTx. La ω-CgTx ocluyó en gran medida la acción del quinlorane (1 μM) en terminales de neuronas PD14. Los insertos 1 y 2 muestran registros representativos en presencia de ω-CgTx (pares de respuestas sinápticas). La subsecuente adición de ω-Aga TK muestra que los canales de calcio de tipo P/Q están presentes en las terminales porque el péptido bloqueó completamente las IPSCs. Pero el agonista dopaminérgico no actúa sobre los canales de calcio de tipo P/Q en la etapa PD14. B: Curso temporal de la amplitud de las IPSCs registradas en presencia de ω-CgTx. La ω-CgTx no afecta la acción del quinlorane (1 μM) en este caso. Las IPSCs registradas provienen de terminales de neuronas PD40. Los insertos 1 y 2 muestran registros representativos en presencia de la ω-CgTx. La adición del quinlorane reduce la amplitud e incrementa la TPP, indicando que el agonista dopaminérgico actúa a pesar de que los canales de calcio de tipo N estén bloqueados. C: el histograma muestra los efectos del quinlorane en presencia de la ω-CgTx en las dos diferentes edades (P < 0.009).

4.1.6. El postpotencial hiperpolarizante es débilmente modulado por el agonista de la familia de receptores D₂ en algunas neuronas

Los canales de calcio de tipo P/Q son la principal fuente de calcio para activar a los canales de K⁺ dependientes de calcio (gK(Ca)) que generan el postpotencial hiperpolarizante (PPH) que produce el intervalo entre potenciales de acción en las NEMs (Vilchis et al., 2000). Su importancia para regular el patrón temporal de disparo en las NEMs ha sido demostrado (Galarraga et al., 1989; Perez-Garci et al., 2003). Se examinaron los efectos de dos agonistas de los receptores D₂ sobre el PPH en neuronas PD40: quinelorane (5 μM) y quinpirole (5 μM). La figura 20 muestra que en neuronas PD40 no se observa modulación en n = 6/18 neuronas (33%; Fig. 20, A-C). Sin embargo, se observa una pequeña modulación en n = 12/18 neuronas (66%; Fig. 20, D-F), para una reducción media del PPH de 1.3 ± 0.26 mV (20%).

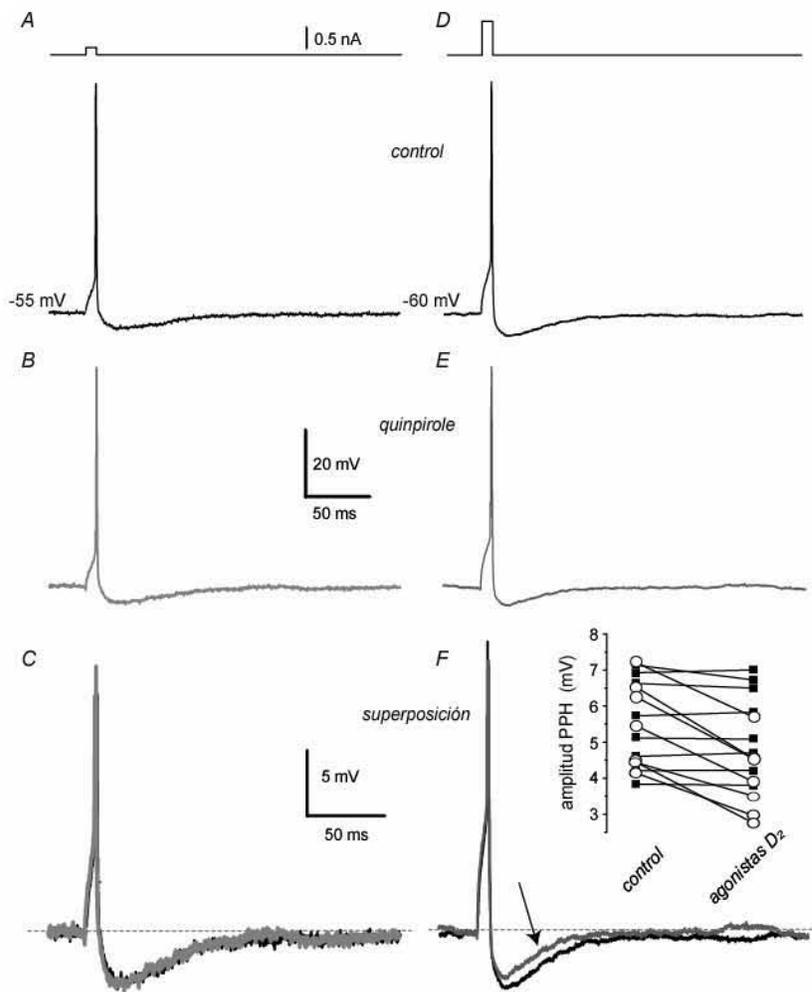


Figura 20. La activación de los receptores dopaminérgicos D₂ modula ligeramente el PPH de algunas NEMs. A, D. Control: Un potencial de acción (abajo) se indujo con un breve pulso de corriente despolarizante (arriba) desde un potencial de mantenimiento de entre -55 mV y -60 mV (abajo). B, E: La adición de un agonista selectivo de la familia del receptor D₂, en este caso quinpirole (5 μM), no redujo el PPH en cerca del 30% de las células (B) pero si lo redujo alrededor de un 20% en cerca del 65% de las neuronas (E). C, F: Superposición de los registros mostrados en A, B y D, E, respectivamente. La gráfica del inserto en F muestra el comportamiento, neurona por neurona, de toda la muestra: círculos vacíos = modulación del PPH.

redujo alrededor de un 20% en cerca del 65% de las neuronas (E). C, F: Superposición de los registros mostrados en A, B y D, E, respectivamente. La gráfica del inserto en F muestra el comportamiento, neurona por neurona, de toda la muestra: círculos vacíos = modulación del PPH.

4.2 Apartado II

Los resultados presentados hasta ahora demuestran que la activación de los receptores D_2 reduce la ICa^{2+} dada por los canales Ca_v1 (de tipo L) y $Ca_v2.1$ (de tipo P/Q) en células adultas (Salgado et al., 2005; trabajo incluido en el Apartado I). Con respecto al canal de tipo L, hay un claro antagonismo entre los efectos de ambas familias de receptores: la activación de los receptores D_1 aumenta la corriente (Surmeier et al. 1995) lo cual produce un incremento en la frecuencia de disparo para un mismo estímulo (Hernández-López et al. 1997), por el contrario, la activación de los receptores de la familia D_2 disminuye la corriente (Hernández-López et al. 2000; Salgado et al., 2005), lo que reduce la frecuencia para un mismo estímulo. Los receptores D_1 utilizan una vía asociada a la AC y la PKA (ver Introducción 1.13), mientras que los receptores D_2 utilizan una vía asociada a la PLC y la PP-2B (ver Introducción 1.14). Pero también hemos dicho que ambas respuestas pueden darse en la misma neurona. Entonces, ¿cuál predomina? En esta tesis pretendemos dar respuesta a esta pregunta.

A continuación se presentan experimentos en donde se administraron agonistas selectivos de los receptores tanto de la familia D_1 como D_2 para observar la respuesta de las neuronas espinosas medianas. Sólo se muestran los resultados de neuronas que presentaron ambas respuestas (más del 60%).

4.2.1 Incremento en la corriente de calcio por la activación de los receptores

D₁

Como es sabido, la técnica de registro en célula entera dializa al inhibidor intrínseco de la PP-1, el DARPP-32 (Surmeier et al. 1995). Aun cuando se usa el “parche perforado” (resultados no mostrados), es imposible obtener la respuesta que se observa con registro intracelular sobre la conductancia de calcio (Pérez-García, 2003 –tesis Doctoral). Por ello decidimos sustituir el inhibidor endógeno de la PP-1 con otros inhibidores, ya sea agregados a la solución extracelular, ácido okadaico (1 μ M) por 40 minutos, o en la solución intracelular (en la pipeta de registro), como la microcistina (5 μ M). El ácido okadaico y la microcistina inhiben tanto a PP-1 como PP-2A a estas concentraciones (Surmeier et al., 1995), pero son poco selectivos para la PP-2B (calcineurina). Como ya se había reportado previamente (Surmeier et al., 1995), bajo estas condiciones, la activación de los receptores de la familia D₁ incrementa $I_{Ca^{2+}}$ (Fig. 21 A y B).

En las Figuras 21 A y B se muestra que, en presencia del ácido okadaico, la aplicación del agonista selectivo para la familia del receptor D₁, el SKF-81297 (1 μ M), incrementó la $I_{Ca^{2+}}$ (trazo gris en Fig. 21 A). Este incremento fue de $27 \pm 3\%$ (n = 12; P < 0.003; U de Wilcoxon; Fig. 21A). El curso temporal (Fig. 21 B) muestra que el efecto es reversible, pues la corriente regresa a su amplitud inicial al lavar el agonista (Fig. 21 B). Las Figuras 21 C y D muestran que el efecto del agonista D₁ puede ser mimetizado por un análogo no hidrolizable del AMPc, el 8-Br-AMPc (100 μ M). El incremento en la $I_{Ca^{2+}}$ que produjo este activador de la PKA no fue significativamente diferente al producido por el agonista D₁: $30 \pm 3\%$ (n=3; P = 1.0;

ANOVA Tukey; Fig. 21 C). El curso temporal de este experimento muestra que este efecto también es reversible (Fig. 21 D).

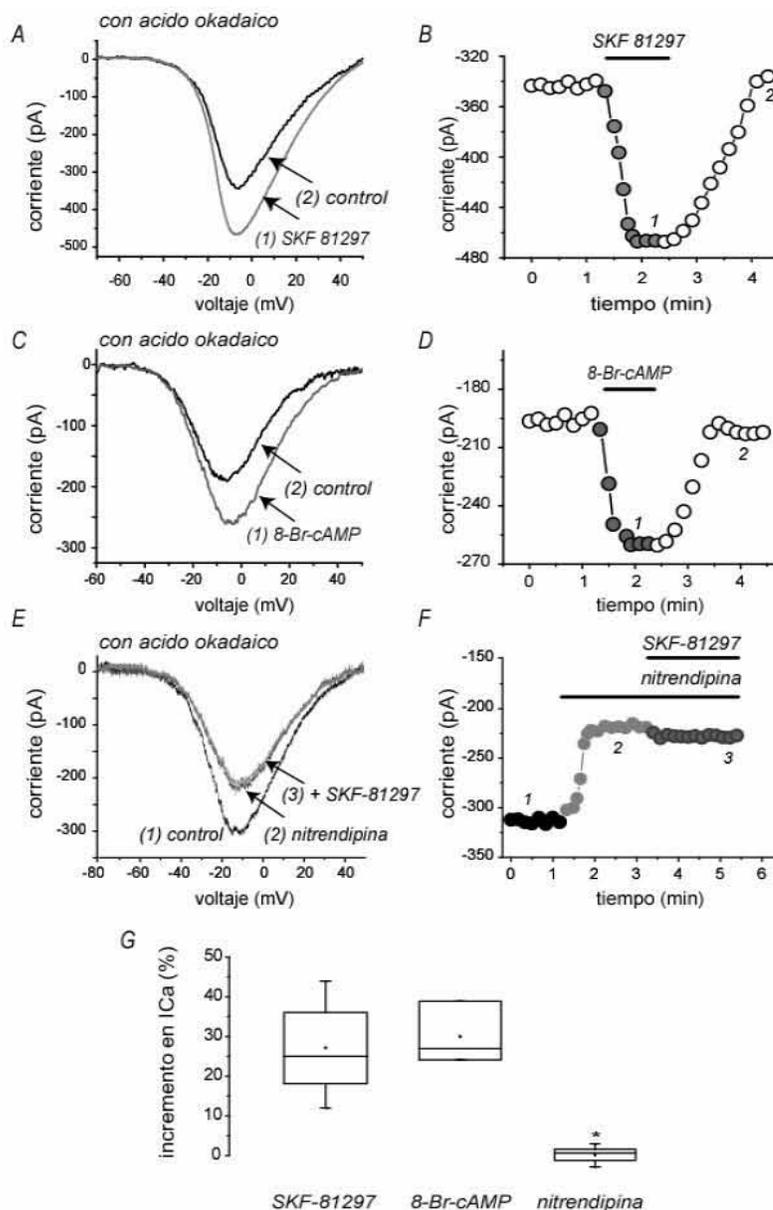


Figura 21. La corriente de calcio es modulada por los agonistas D1. A: En presencia de ac. okadaico (ver texto), el agonista D1, SKF81297 (1 μ M) incrementa la corriente. B. Efecto que es reversible. C. Lo mismo sucede con el 8-Br-cAMP (100 μ M). D. Cuyo efecto también es reversible. E y F. Al bloquear los canales de tipo L con la nitrendipina (10 μ M), el efecto del agonista D1 se ocluye casi totalmente, lo cual sugiere que el blanco de la modulación son los canales L. G. Cajas de Tukey ilustrando las distribuciones de las muestras experimentales.

La presencia del bloqueador selectivo de los canales de tipo L (Ca_v1), nitrendipina ($10 \mu\text{M}$), ocluyó totalmente el efecto del agonista D_1 SKF-81297 (Fig. 21 E; $n=5$). El curso temporal de un experimento representativo se puede ver en la Figura 21F. El resumen comparativo de estas series experimentales se puede apreciar en la Figura 21 G, donde se muestra que la diferencia en el efecto del agonista D_1 en presencia o ausencia de nitrendipina es significativa (Fig. 21 G; $P \leq 0.001$; ANOVA Tukey). Para resumir, cuando los canales de calcio de tipo L son bloqueados, el agonista D_1 tiene un efecto mínimo, lo que sugiere que estos canales son el blanco predominante de la modulación.

4.2.2 La activación de los receptores D_2 previene el efecto producido por la activación de los receptores D_1 .

Ahora bien, como vimos en el Apartado I (Salgado et al., 2005), la activación del receptor D_2 tiene el efecto contrario a la activación del receptor D_1 : reduce la $I_{Ca^{2+}}$. Este efecto es mediado por una vía de señalización que inicia con la activación de la PLC (ver Introducción 1.14. –Fig. 6) (Hernández-López et al., 2000). Para determinar cual de los dos efectos predomina los agonistas D_1 y D_2 se administraron secuencialmente en distinto orden: primero el agonista D_1 y luego el agonista D_2 y viceversa. En la Figuras 22 A y B se muestra que el agonista D_1 , SKF-81297, incrementa la $I_{Ca^{2+}}$ cuando se administra primero. Sin embargo, la aplicación posterior del agonista del receptor D_2 , quinelorane, no sólo revierte la acción del agonista D_1 sino que reduce la corriente en un $49 \pm 3 \%$ del control ($n=3$; Figura 22 A). De manera interesante el efecto neto del agonista D_2 en estas

condiciones es mayor que si se administrara sólo: $36 \pm 3\%$ ($n = 12$; Aparatado I – Salgado et al., 2005). Esta diferencia fue significativa ($P \leq 0.004$; ANOVA Tukey) lo que indica que la activación del receptor D_2 revirtió el aumento en la corriente de calcio por la activación del receptor D_1 . El curso temporal de este experimento está ilustrado en la Figura 22 B.

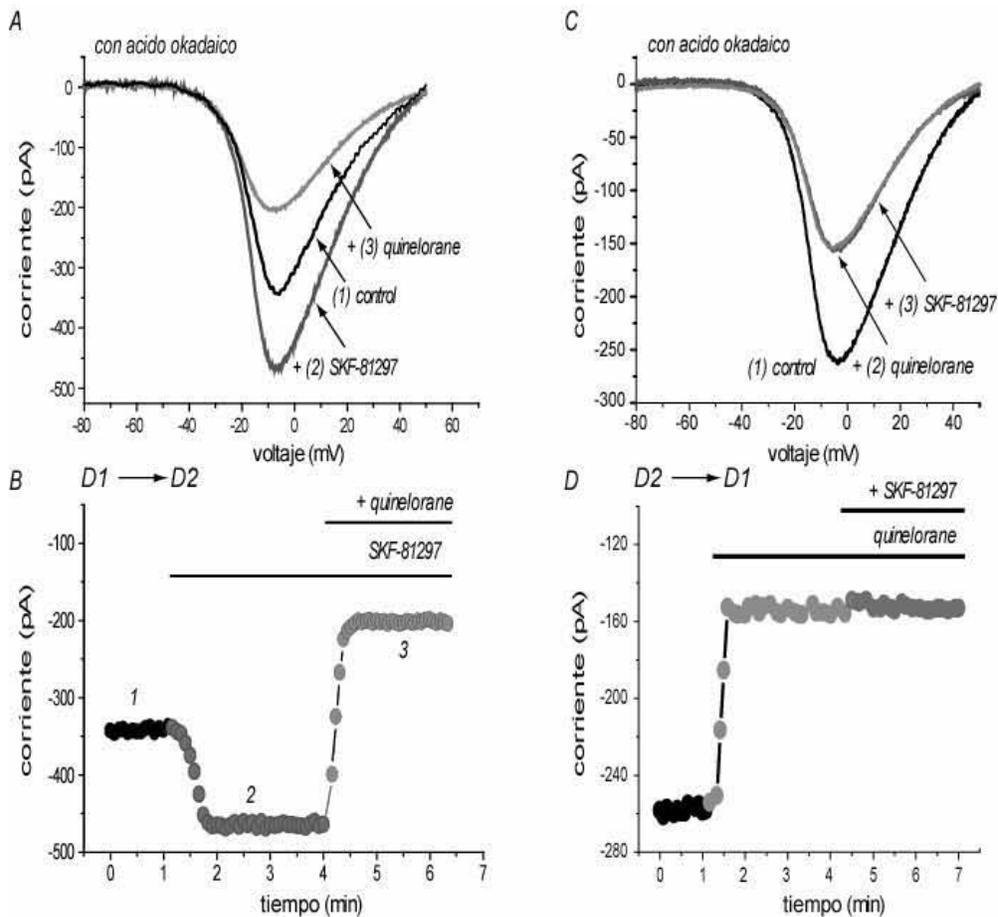


Figura 22. Las acciones del receptor D_2 predominan sobre las del receptor D_1 . A. Si primero se administra el agonista D_1 la Ca^{2+} aumenta, pero el efecto es revertido por el agonista D_2 cuando se administra después. B. El curso temporal muestra que el agonista D_2 no sólo revierte si no aún sobrepasa la amplitud basal, siendo el efecto total mayor que si se administrara solo. C. Cuando el agonista D_2 se administra primero, la corriente se reduce como es usual (Salgado et al., 2005). Si posteriormente se administra el agonista D_1 este no produce ningún efecto. D. Curso temporal del experimento ilustrado en C. Los números indican el orden de aplicación.

¿Qué pasa si se invierte el orden de aplicación de los agonistas? Las Figuras 22 C y D ilustran que cuando se administra primero el agonista D₂, la corriente se reduce como es usual y ha sido reportado (Hernández-López et al., 2000; Salgado et al., 2005 en el Apartado I). Interesantemente las mismas figuras ilustran que si después del efecto del agonista D₂ se administra el agonista D₁, este no tiene ningún efecto. En otras palabras, este resultado nos dice que la acción D₂ es siempre predominante, sin importar el orden de aplicación de los agonistas.

4.2.3. El efecto dominante de los receptores D₂ no involucra la inhibición de la AC

Las Figuras 23 A y B muestran que este nuevo efecto D₂: el no permitir que se manifiesten las acciones D₁, esta mediado específicamente por el receptor D₂, puesto que la presencia del antagonista selectivo sulpiride (1 μM), bloqueó por completo, tanto la reducción de la Ica²⁺ como la acción sobre el efecto D₁. Note que en presencia del sulpiride, el SKF 81297 ya puede incrementar la corriente (n=6; P ≤ 0.001; ANOVA Tukey). Se ha dicho que algunas de las acciones D₂ están mediadas por la inhibición de la AC. Para ver si este efecto es mediado por esta enzima, decidimos probar al agonista D₂ pero en presencia del 8-Br-AMPC, o lo que es lo mismo, en condiciones en las que el AMPc ya se encuentra elevado.

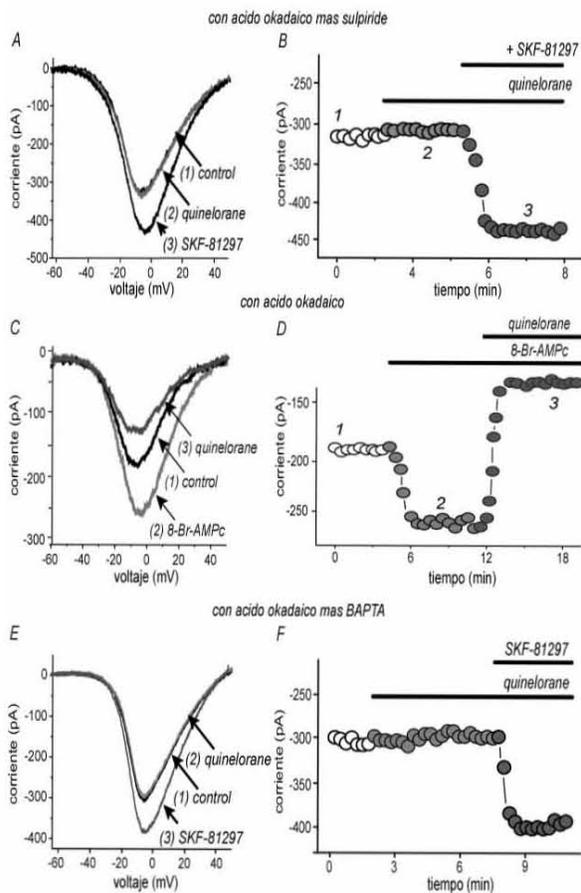


Figura 23. La acción D_2 sobre el receptor D_1 es específica y no está mediada por la AC sino por una vía de señalización difusible y dependiente de calcio. A. En presencia del antagonista D_2 , sulpiride, el quinelorane ya no actúa sobre la ICa^{2+} ni evita el efecto D_1 . B. Curso temporal de A. C. El quinelorane revierte la acción del 8-Br-cAMP y reduce la corriente; sugiriendo que el efecto no es a través de AC. D. Curso temporal del experimento en C. E. El efecto del agonista D_2 depende de una vía de señalización que requiere del aumento en el calcio intracelular (ver Introducción 1.14 y Hernández-López, 2000): la adición de BAPTA (15 mM) en la solución intracelular también bloquea los efectos D_2 , lo que permite que se manifieste la acción D_1 . F. Curso temporal de E.

La Figura 23 C y D, muestra que los efectos D_2 no están siendo mediados por la inhibición de la AC. Se observa que la adición de 8-Br-AMPC (100 μ M) incrementa la corriente al activar directamente a la PKA (sin tener que activar a la AC), y sin embargo, la activación del receptor D_2 revierte el efecto del activador de

la PKA y aun más, reduce la corriente más allá de la amplitud basal. En total, la adición de quinolorane (10 μM) redujo la corriente en un $50 \pm 1\%$ (Fig. 23 C; $P < 0.003$ comparada con el efecto del quinolorane solo; ANOVA Tukey). El curso temporal de un experimento representativo se puede observar en la Figura 23 D. Este resultado indica que el efecto del receptor D₂ no se da a través de la inhibición de la AC. En presencia del agonista del receptor D₂, la adición posterior del 8-Br-AMPC tampoco fue capaz de tener un efecto (no mostrado). Estos datos sugieren que la activación de los receptores D₂ inutiliza la señalización del receptor D₁ a un nivel de la cascada que está más allá de la AC.

¿Cuál será este nivel? Como ya se mencionó en la introducción, (Hernández-López et al. 2000), una de las vías activadas por el receptor D₂ moviliza calcio de las pozas intracelulares al activar a la PLC β 1, produciendo IP₃ y DAG. Esto puede activar a la Ca²⁺-CaM y a la PP-2B (Fig. 6). También puede activar a la PKC, que en caso de ser del tipo convencional necesita del Ca²⁺ intracelular. Por lo tanto, para probar si alguna de estas vías podría estar implicada, en el efecto estudiado, decidimos quelar el Ca²⁺ intracelular para observar si la señalización utilizada por el receptor D₂ para bloquear la acción del receptor D₁ es difusible y requiere del Ca²⁺ intracelular. Así, investigamos los efectos de 10 μM de quinolorane en células que previamente habían sido perfundidas intracelularmente con 15 mM de BAPTA (en la pipeta de registro). Las Figuras 23 E y F muestran que bajo estas condiciones la aplicación de 10 μM del agonista D₂ ya no produce efecto ($n=9$; $P \leq 0.001$; ANOVA Tuckey). Aun más, el efecto producido por la adición de SKF81297 (1 μM) ya no se vio impedida,

pues este incrementó la $I_{Ca^{2+}}$ en un $25 \pm 2\%$ ($n = 6$; Fig. 23 E). El curso temporal de uno de estos experimentos puede observarse en la Figura 23 F. Esto nos mostró que el efecto de los receptores D_2 sobre los receptores D_1 depende de la movilización del calcio intracelular, cascada debajo de la AC y posiblemente utilizando la vía PLC/PP-2B.

4.2.4. Evidencia sobre la participación de la calcineurina en el efecto que ejercen los receptores D_2 sobre los D_1

Ya se mencionó que los receptores D_2 modulan corrientes de calcio de tipo L a través de la vía PLC-calcineurina (Hernández-López et al., 2000). Por lo tanto, investigamos si la inhibición de la calcineurina (PP2B) ya sea con su péptido auto-inhibidor (PICaN), o con su inhibidor selectivo, el FK506, podían reducir este efecto D_2 . Así, en las Figuras 24 A y B se ilustra un experimento representativo en el que se añadió PICaN ($1 \mu\text{M}$) para inhibir la PP-2B, que se sabe es el paso final para explicar muchas de las acciones del receptor D_2 (Hernández-López et al., 2000). Se observa que si se inhibe este paso de la señalización D_2 , el agonista D_1 ($1 \mu\text{M}$ SKF 81297) ya no se ve impedido de aumentar la corriente un $29 \pm 3\%$ ($n = 6$; $P \leq 0.003$; ANOVA Tuckey, Fig. 24 A y B). Aunque la acción de quinelorane ($10 \mu\text{M}$) no fue totalmente bloqueada ($n = 6$; Fig. 24 A y B), el efecto D_2 ($9 \pm 3\%$) fue significativamente menor al control (en ausencia del PICaN) ($P \leq 0.001$; ANOVA Tukey).

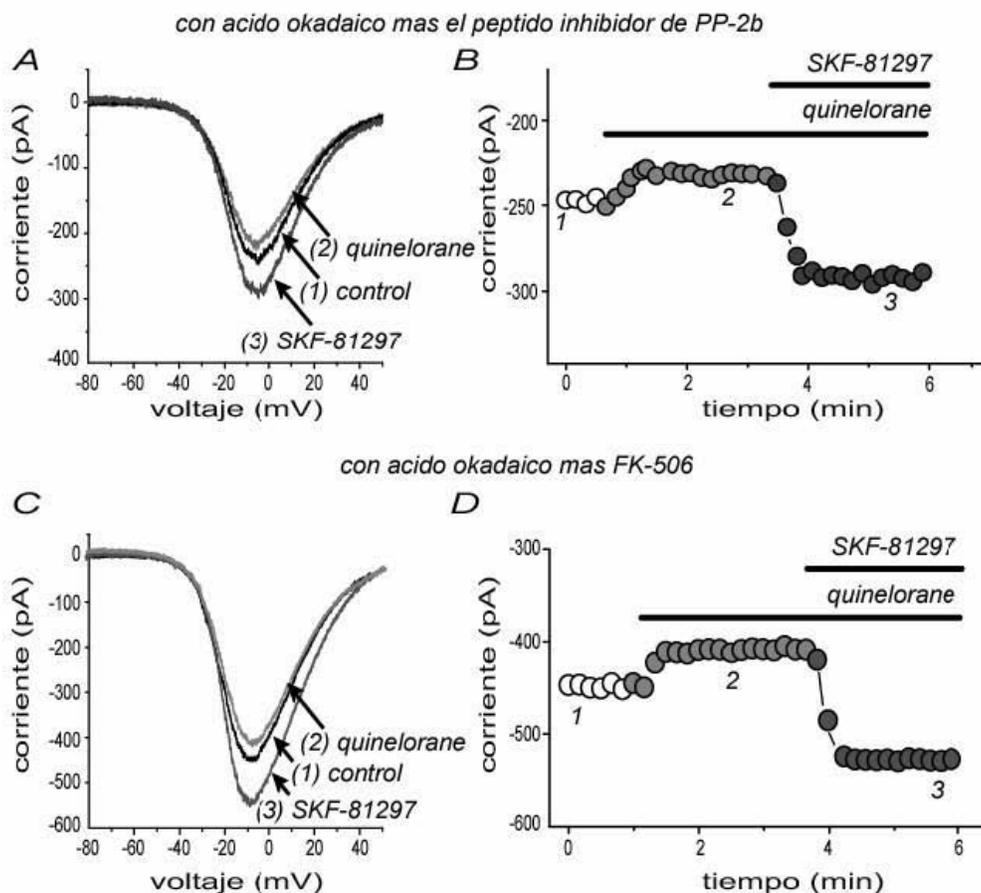


Figura 24. Si se bloquea la calcineurina, pueden manifestarse las acciones D1, aun en presencia del agonista D2. A. En este experimento tenemos dos bloqueadores de fosfatasa, el de la PP-1 (ác. okadaico) para permitir las acciones D1, y el péptido autoinhibidor de la PP-2B, para ver si se bloquea la acción D2 sobre la acción D1. Puede verse que este fue el caso. B. Curso temporal del experimento en A. C. Lo mismo sucedió si utilizamos otro inhibidor de la PP-2B, el FK506 (1 μ M). D. Curso temporal del experimento en C.

Las Figuras 24 C y D muestran que los mismos resultados se obtuvieron con otro bloqueador de los efectos de PP-2B: 1 μ M de FK506. Aunque la acción D₂ no se abatió totalmente, pues la reducción en la $I_{Ca^{2+}}$ llegó al $9 \pm 1\%$ ($n = 5$; $P \leq 0.001$; ANOVA Tukey; Fig. 24 C y D), el efecto del agonista D₁ (1 μ M SKF 81297) también fue manifiesto, incrementando la corriente en un $28 \pm 1\%$ ($n = 5$, $P \leq 0.001$; Fig. 24 C y D). Lo anterior nos permite concluir que el bloqueo parcial de la

calcineurina impide los efectos D_2 (Hernández-López et al. 2000), entre ellos, el de no permitir que haya efectos D_1 . Esto es evidencia de que la actividad de la calcineurina es necesaria para bloquear el incremento de las corrientes de calcio de tipo L debida a la activación de los receptores dopaminérgicos D_1 .

Con estos resultados podemos concluir que en las neuronas espinosas medianas, la activación de los receptores dopaminérgicos D_2 tienen un efecto predominante sobre los receptores D_1 , en la modulación de las corrientes de calcio de tipo L. Este efecto depende de los niveles de calcio intracelular, necesario para activar Ca^{2+} -CaM y PP-2B. Investigaciones posteriores nos permitirán saber porque esto es así, ¿es la calcineurina quien desfosforila al canal de calcio de tipo L? Sabemos que la calcineurina también inhibe la fosforilación de DARPP-32 y por lo tanto, en condiciones fisiológicas, esto impediría la inactivación de PP-1. Ambas fosfatasas mantendrían al canal en su mínimo estado conductivo lo que nos lleva a pensar que, en los presentes experimentos sólo hemos visto parte del mecanismo pues mantuvimos a PP-1 inactivada con ác. okadáico.

Estos resultados dejan abierta la siguiente pregunta: ¿Habría alguna condición fisiológica en que las acciones D_1 predominen sobre las acciones D_2 ? Ya que si no, ¿Para que quiere la misma célula ambos receptores? En la literatura aun se reportan efectos sinérgicos entre los dos (Hopf et al., 2003), ¿Cómo es esto posible? Lo anterior sólo indica que queda mucho por saber de la señalización dopaminérgica (Beaulieu et al., 2005; Gerfen et al., 2002; Park et al., 2005) y mucho más de la “traducción” o correlación de ésta con los efectos sobre los canales iónicos y el disparo neuronal.

CAPITULO 6

Discusión

5.1 La contribución de los canales de calcio cambia durante el desarrollo.

Las neuronas espinosas medianas (NEM) o de proyección del neostriado, expresan todos los tipos de canal de calcio de la subfamilia Ca_v2 : N, P/Q y R (Bargas et al. 1994; Foehring et al. 2000; Merlmeistein et al. 1999). Los resultados expuestos en esta tesis demuestran que los canales de calcio activados por voltaje de la familia Ca_v2 , de las neuronas neostriatales de proyección, cambian su expresión tardíamente durante el desarrollo postnatal (entre PD14 y PD40). La contribución de los canales $Ca_v2.2$ (N) disminuye, mientras que la contribución de los canales $Ca_v2.1$ (P/Q) incrementa. Sin embargo, la contribución de las corrientes de calcio dadas por los canales Ca_v1 (L) y $Ca_v2.3$ (R), a la corriente total, se mantiene constante.

Sorprendentemente, la densidad total de corriente no cambia durante este proceso. Para que esto suceda, la disminución en la expresión del canal de tipo N, tiene que ser compensada de manera casi exacta, por el incremento en la expresión del canal de tipo P/Q. Es decir, parece haber un recambio de un canal por otro. La cuestión ahora es averiguar que cambios funcionales se dan en las neuronas como resultado de esta reconfiguración de los canales. ¿Cuál es el objetivo de la misma? Al responder a esta pregunta se podrá, quizás, obtener

respuestas a otras preguntas relevantes: ¿Por qué tantos canales de calcio?, ¿Cuál es la diferencia funcional entre unos y otros?

En este trabajo de tesis, exploramos en primer lugar lo que sucede en la sinapsis. Los resultados mostraron que la reconfiguración de los canales de calcio ocurre en paralelo tanto en el soma como en las terminales sinápticas de las neuronas neostriatales de proyección. Así, la contribución de los canales de calcio de tipo N en la liberación de GABA de las terminales sinápticas se reduce durante este periodo, mientras que la participación de los canales de calcio de tipo P/Q se incrementa. En otras palabras, la sinapsis cambia los canales de calcio que usa para liberar el transmisor. Cambios muy parecidos han sido observados en las sinapsis de neuronas cerebelares y talámicas (Iwasaki et al. 2000), pero nadie había mostrado que estos cambios suceden en paralelo tanto en el soma como en las terminales sinápticas de la misma neurona. Suponiendo que cada tipo de canal cumple con procesos críticos durante el desarrollo. Por ejemplo, la transmisión sináptica temprana, acompañada de crecimiento de neuritas y patrones temporales de disparo característicos del desarrollo, puede requerir la presencia de canales de tipo N. En etapas más avanzadas, cuando se ha estabilizado la transmisión, se requerirá entonces del canal de tipo P/Q. Averiguar porque esto es así es un reto para futuras investigaciones.

5.2 Participación del receptor D₂ en la modulación de la corriente de calcio de la subfamilia Ca_v2 en las neuronas espinosas medianas

En la presente tesis también tratamos de ver que sucede con la modulación dopaminérgica, pues antes del presente trabajo no existían trabajos acerca de la modulación dopaminérgica D₂ sobre los canales Ca_v2. En esta tesis mostramos experimentos que indican que, en efecto, los canales Ca_v2 son modulados por la dopamina a través de receptores de la familia D₂. La modulación de los receptores D₂ sobre los canales Ca_v2 resultó ser cercana a la mitad de la modulación total de la I_{Ca²⁺} en ambas etapas del desarrollo. Lo que indica que es cuantitativamente importante. Sorprendentemente, los experimentos demostraron que la modulación dopaminérgica D₂ modula las corrientes de calcio de tipo N durante etapas tempranas del desarrollo pero no en etapas tardías, en las que el canal modulado es el P/Q. Es decir, la modulación cambia a su efector en etapas más maduras: dejando al canal de tipo N y adoptando al canal de tipo P/Q. En otras palabras, toda la vía de señalización asociada al receptor D₂ cambia de blanco. O lo que es lo mismo, el que una entidad molecular, como por ejemplo un canal, cambie su expresión, es sólo un aspecto del problema. Bien puede significar que al cambiar la molécula se tengan que cambiar todos los mecanismos reguladores de la misma. Esto lleva a las siguientes preguntas interesantes, ¿Cómo puede redirigirse una vía de señalización?, ¿Cuál es la señal?, ¿Una hormona, un factor trófico, otra vía de señalización? Estos resultados apoyan lo reportado por Elezgarai y colaboradores (1999) que postulan que los cambios en la contribución de canales en combinación con los cambios en

la expresión de receptores remodelan la modulación ejercida, en la excitabilidad neuronal, por los diferentes neurotransmisores. Es notable que un incremento importante en el número de terminales sinápticas dopaminérgicas en el neostriado ocurre durante la segunda y tercera semana posnatal (Antonopoulos et al., 2002).

El orden de potencia para la modulación de canales Ca_v mediada por el receptor D_2 en neuronas de la etapa PD14 es: $N > L \gg P/Q$. En contraste en neuronas de PD40 es: $L > P/Q \gg N$. Estos eventos del desarrollo no habían sido reportados hasta el momento. Por otro lado, en neuronas simpáticas del pollo se reportó que la contribución de los canales de calcio cambia con el desarrollo pero que la modulación ejercida por la somatostatina persiste sin cambios (White et al. 1997).

Existen ejemplos en la literatura de la modulación mediada por los receptores D_2 sobre cada tipo de canal, N o P/Q, de la subfamilia Ca_v2 . Así, los canales de tipo N son modulados por los receptores dopaminérgicos D_2 en interneuronas colinérgicas neostriatales, en neuronas del globo pálido, en motoneuronas espinales y en células de la línea celular NG108-15 (Brown and Seabrook, 1995; Stefani et al. 2002; Wikstrom et al. 1999; Yan et al. 1997). Por otro lado, la modulación de canales de tipo P/Q ha sido reportada en neuronas dopaminérgicas y en la línea celular AtT-20 (Cardozo and Bean, 1995; Kuzhikandathil and Oxford, 1999; Wolfe et al. 1999).

Por consiguiente, como resultado de los presentes experimentos, se puede cuestionar si el cambio en la modulación dopaminérgica puede tener lugar en

otras células, y de ser así, si estos cambios ocurren simultáneamente en diferentes regiones del cerebro.

5.3 Participación del receptor D₂ en la modulación de la corriente de calcio de la subfamilia Ca_v1 en las neuronas espinosas medianas

Por otro lado, el uso de la nitrendipina permitió confirmar que los canales de calcio Ca_v1 (de tipo L) son modulados en las neuronas neostriatales de proyección por activación de los receptores dopaminérgicos D₂, tanto en etapas tempranas como en etapas más maduras. Esto podría indicar que el control de la función entrada-salida (I/O) de la neurona (intensidad del estímulo vs. frecuencia de disparo) necesita ser controlada por la dopamina durante todo el desarrollo (Hernández-López et al. 1997; 2000; Pérez-Garcí et al. 2003). Sin embargo, esta modulación se vuelve más importante en etapas maduras. Esto lo parece indicar un ajuste de nuestros datos a un sistema de ecuaciones simultáneas (ver Vilchis et al. 2002) que arrojó un 20% de modulación de la corriente de calcio de tipo L en la etapa PD14 y un 80% en la etapa PD40. Es decir, aquí los canales no cambian, aunque la modulación dopaminérgica vaya en aumento y cada vez abarque a un mayor número de canales. Estos resultados concuerdan por los obtenidos por Hernández-López et al. 2000; donde se señala al canal de calcio Ca_v1 (L) como el principal blanco de modulación por la activación del receptor dopaminérgico D₂. Por otro lado, las neuronas espinosas medianas expresan dos tipos de canales de la subfamilia Ca_v1, el Ca_v1.2 y el Ca_v1.3 (Olson et al. 2005). Se requiere hacer estudios más profundos para determinar si los dos tipos de canal están siendo igualmente modulados por la activación del receptor D₂.

Interesantemente, se ha reportado que la activación de los receptores D₂ modula la corriente de calcio de tipo L en motoneuronas espinales, en células granulares cerebelares (Wikstrom et al. 1999; Mei et al. 1995), así como en melanotrofos, donde se ha descrito que la activación de los receptores D₂ reduce la corriente de calcio de tipo L, así como la expresión del gen para la subunidad α 1 del canal (Fass et al. 1999).

5.4 Posible significado funcional del cambio en la modulación dopaminérgica de las corrientes de calcio de las terminales sinápticas

Una de las funciones celulares importantes de los canales de calcio Ca_v2.1 y Ca_v2.2 es en la liberación de GABA de las terminales sinápticas, en particular, de las neuronas espinosas medianas (Tecuapetla et al. 2005). Se ha demostrado que la activación de los receptores D₂ disminuye la liberación de GABA de las terminales de estas neuronas (Guzmán et al. 2003; Cooper y Stanford, 2001). Una pregunta respondida en el presente trabajo es si el recambio de los canales N y P/Q observado en la membrana somatodendrítica se correspondía con un recambio similar en las terminales sinápticas. Nuestros resultados muestran que la modulación presináptica mediada por los receptores dopaminérgicos D₂ fue ocluida por el bloqueador específico del canal de calcio de tipo N, la ω -CgTx, en neuronas juveniles (PD14), pero no en neuronas maduras (PD40), donde la ω -AgaTK resultó ser el bloqueador efectivo de la transmisión y de la modulación dopaminérgica. Esto evidencia que la modulación mediada por la activación del receptor D₂ de la transmisión sináptica también cambia de blanco en las

terminales sinápticas. Se conoce que los distintos tipos de canal de calcio presinápticos están asociados con distintos patrones de liberación de neurotransmisor y por tanto con distintas dinámicas de corto plazo. Por ejemplo, los canales de calcio de tipo N favorecen la facilitación sináptica, mientras que los canales de tipo P/Q favorecen la depresión sináptica (Scheuber et al. 2004; Ali y Nelson, 2005). Ambas formas de plasticidad tienen papeles diferentes a la hora de integrar la información (Scheuber et al., 2004; Zucker y Regehr, 2002). Por otro lado, se conoce que la modulación de las terminales sinápticas por DA en las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo puede modificar la plasticidad sináptica a corto plazo (Baimoukhametova et al. 2004).

5.5 Significado funcional de la modulación dopaminérgica de las corrientes de calcio en el patrón temporal de disparo

En las neuronas espinosas medianas, las corrientes de potasio activadas por calcio son activadas por el calcio que entra a las células a través de canales de calcio dependientes de voltaje de la subfamilia Ca_v2 : el tipo $Ca_v2.1$ (P/Q) y el tipo $Ca_v2.2$ (N). El bloqueo de estos canales con toxinas específicas reduce el pospotencial hiperpolarizante (PPH) que sigue a un potencial de acción (Vilchis et al., 2000), y por lo tanto, cambia el número de disparos ante un mismo estímulo.

El bloqueo de los canales N y P/Q, deja de meter el calcio necesario para activar las corrientes de potasio activadas por calcio ($IKCa^{2+}$) que son responsables, en parte, de generar el PPH. Al reducirse el PPH, disminuye el intervalo entre las espigas, lo que aumenta la excitabilidad de las neuronas

estriatales (Pérez-Garcí et al. 2003). Sin embargo, en la mayoría de las neuronas hay que bloquear ambos canales, el N y el P/Q, para que este efecto sea evidente (Pérez-Garcí et al., 2003). El efecto que se obtiene al bloquear sólo uno de ellos es muy pequeño. Lo que habla de colaboración entre canales para realizar la función de generar el PPH. En contraste, al bloquear los canales de tipo L se reduce la excitabilidad (Pérez-Garcí et al. 2003), esto es así debido a que el canal L genera la meseta despolarizante que produce el disparo y resulta en la curva entrada-salida (I/O). Al bloquear el canal L se colapsa la función I/O de la neurona, que pierde su rango de frecuencias, respondiendo ahora con la misma frecuencia ante cualquier estímulo. En otras palabras, el canal L confiere las propiedades codificadoras a una neurona. Lo anterior demuestra que los distintos canales de calcio presentes en las neuronas están especializados en cumplir tareas específicas. Durante el disparo, los N y P/Q dictan la frecuencia ante un estímulo, mientras los L, demarcan los rangos de frecuencia posibles.

Ahora bien, en este trabajo encontramos que el PPH de las NEM es mínimamente afectado por los receptores D_2 en neuronas adultas ya que, la afectación se reduce al 15% de la amplitud y sólo en la mitad de los casos. Esto no produce ningún efecto sobre la frecuencia de disparo. Lo anterior probablemente se debe a que la activación del receptor D_2 solamente afecta uno de los dos canales, el de tipo P/Q en las neuronas adultas. Y como se necesita bloquear los dos, N y P/Q, para realmente observar un cambio en la frecuencia, se puede concluir que la modulación diferencial de sólo uno de los dos canales tiene por objeto el que la dopamina no afecte al PPH. En contraste, la ACh

actuando sobre receptores muscarínicos del tipo M_1 afecta a ambos canales, el N y el P/Q, y como consecuencia de ello, éste transmisor afecta de manera importante al PPH y a la frecuencia de disparo (Pérez-Reselló et al., 2005). Esto sugiere que la modulación diferencial de efectores, en este caso canales iónicos, podría tener como objeto el repartir las funciones modulables por neurotransmisores en una misma célula.

Por otro lado, la activación de los receptores D_2 disminuye la frecuencia de disparo ante un mismo estímulo al inhibir las corrientes de calcio de tipo L. Esto es, el efecto predominante D_2 sobre el disparo es inhibitorio, debido a que la modulación que predomina es sobre el canal L (Hernández-López et al. 2000); mientras que el efecto predominante de la ACh es excitador, pues el efecto predominante es sobre los canales N y P/Q. He aquí, como dos receptores (M_1 y D_2) que comparten en gran medida la misma vía de señalización (PLC/IP₃-DAG) (Rakhilin et al., 2004), pueden tener efectos contrarios sobre el disparo: uno lo aumenta y el otro lo disminuye. Esto se debe a que en los pasos finales de la vía de señalización ambos transmisores difieren y el efector final no es el mismo. O sea, misma vía de señalización no quiere decir mismos efectos.

5.6 Acciones opuestas de los receptores D_1 y D_2 en la modulación de las corrientes de calcio Ca_v1 en las neuronas espinosas medianas.

Recapitulando, 1) El neostriado es altamente innervado por terminales dopaminérgicas. 2) La regulación de los canales de tipo L para modular el disparo de las neuronas estriatales es muy importante para explicar los efectos de la DA a nivel sistémico y 3) Dos familias de receptor coexisten en las neuronas estriatales:

D₁ y D₂. El primero aumenta la corriente llevada por los canales L, y por tanto aumenta la excitabilidad. Esto lo hace a través de la vía: AC/AMPC/PKA/DARPP-32/PP-1. Por otro lado, el receptor D₂ disminuye la corriente llevada por los canales L y por tanto disminuye la excitabilidad. Lo hace a través de la vía. PLC/IP₃ -DAG/Ca²⁺-Ca²⁺CaM/PP-2B. Es decir, D₁ y D₂ tienen efectos contrarios sobre el mismo efector y por tanto sobre las funciones que el mismo tiene. Pero si ambas familias de receptor pueden coexistir en la misma célula (Surmeier et al. 1993; 1996; Hopf et al., 2003; Aizman et al. 2000), ¿cuál de los dos efectos predomina cuando ambos receptores se coactivan? Esta es otra pregunta contestada en la presente tesis.

Nuestros resultados indican que la activación del receptor D₂ tiene como una de sus funciones bloquear el efecto de los receptores D₁. Trabajos concomitantes realizados en nuestro laboratorio (Pérez-García, 2003) coinciden con lo reportado en esta tesis mostrando que la activación de los receptores D₂ revirtió el aumento en la excitabilidad producido en respuesta a la activación de los receptores D₁. Por tanto esta asimetría funcional, si todos los demás factores se mantienen inalterados, explicaría por qué la administración de DA o su precursor L-DOPA, producirán las acciones propias del receptor D₂ y no las del receptor D₁. Es bien sabido que el anterior, es el único efecto de la actual terapia reconstitutiva (Jenner, 2003; Gerlach et al. 2003; Baas et al., 2002). Es decir, esta terapia es parcialmente eficaz pues sólo consigue restituir el efecto de una de las familias de receptores (D₂). En la actualidad, no se cuenta con una terapia para, restituir los efectos de la otra familia, aún administrando fármacos selectivos para

el receptor D₁ (Aubert, 2005), que de hecho adquiere una hipersensibilidad con el tiempo de tratamiento, lo que a la larga es una de las causas desencadenantes de las discinesias incapacitantes que hacen que se descontinúe el tratamiento para la enfermedad del Parkinson. Pensamos que esta tesis muestra porque esto es así. También señala que no sabemos bajo qué condiciones el receptor D₁ predomina sobre el receptor D₂. Mucho menos explica como pueden ser sinérgicos en algunas ocasiones (Hopf et al. 2003). La respuesta futura a estas interrogantes podría ser de suma importancia para replantear la terapéutica de enfermedades asociadas con alteraciones en el sistema dopaminérgico. Esta conclusión es sumamente relevante por dos motivos: 1) Claramente se ve que una de las acciones del receptor D₂ es anular la acción del receptor D₁. Acción que no había sido reportada para el receptor D₂, y 2) Muchas neuronas estriatales presentan ambas respuestas, ¿qué pasa entonces cuando se administra a los pacientes un agonista o un precursor con fines terapéuticos? Nuestros datos sugieren que lo único que se ha de lograr es sustituir la acción D₂ perdida, más no la D₁. ¿Será esta la causa de la hipersensibilización D₁, con el consecuente desequilibrio entre ambos receptores? ¿Será este fenómeno el que lleva a las discinesias tardías? Estos datos entonces dejan un camino digno de ser investigado con posterioridad.

La asimetría funcional debe de tener su explicación a nivel de vías de señalización intracelular activadas por cada familia de receptor. En este sentido, nuestros resultados indican que el efecto dominante de los receptores D₂ sobre la

activación de los receptores D_1 no es a través de inhibir a la adenilato ciclasa, sino que es en otra parte de la vía activada por estos receptores.

La diálisis intracelular con BAPTA, un quelante de calcio de alta afinidad, evitó el efecto inhibitorio de la activación de los receptores dopaminérgicos D_2 sobre las corrientes de calcio; sugiriendo que el incremento en el calcio intracelular es el evento clave en la modulación de la corriente de calcio de tipo L por la activación del receptor D_2 , y por lo tanto, también es un elemento importante en el efecto dominante del receptor D_2 sobre el receptor D_1 . La importancia de la liberación de calcio de las pozas intracelulares es puesta de manifiesto en la predominancia del receptor D_2 . El incremento en los niveles de calcio intracelular provocado por la activación de los receptores D_2 promueve el aumento de la actividad de la fosfatasa calcineurina (PP-2B) (Nishi et al. 1997). Así, el trabajo futuro tiene ya una vía disponible para ser analizada: la interacción entre los efectos de la PKA y el DARPP-32 con el efecto de la PP-2B. En esta tesis encontramos que la inhibición de la PP-2B por la incubación con FK-506 o la diálisis intracelular con el péptido inhibitorio de la calcineurina (PICA), bloquean totalmente el efecto de predominio que tienen los receptores D_2 sobre los D_1 . Estos datos sugieren fuertemente que un incremento en los niveles del calcio intracelular debida a los receptores D_2 promueve la inhibición de los canales de calcio de tipo L por la desfosforilación del canal de calcio mediante la PP-2B, y acaso también la inactivación del DARPP-32, en cuyo caso, la fosforilación del canal por la PKA se debilita. Esta es la hipótesis que queda para estudiar en las futuras investigaciones del laboratorio. Ambas, PKA y PP-2B se encuentran colocalizadas y unidas a la proteína de anclaje a la

membrana AKAP-79 (Santana et al. 2002). Sin embargo, se desconoce ¿En que condiciones fisiológicas se puede dar la inhibición de la calcineurina para permitir el efecto D_1 ?

CONCLUSIONES

1. Aunque la densidad de corriente de calcio es similar en neuronas de proyección neostriatales jóvenes (PD14) y maduras (PD40), la proporción de los componentes de dicha corriente cambia.

2. En particular, la expresión de los canales de tipo N disminuye mientras que la de los canales de tipo P/Q aumenta durante el desarrollo. Las corrientes de tipo L y R se mantienen prácticamente inalteradas.

3. La transmisión sináptica GABAérgica proveniente de las terminales de las mismas neuronas de proyección neostriatales recae sobre los canales de tipo N y P/Q en animales juveniles, pero a edades mayores, afecta exclusivamente a los canales de tipo P/Q.

4. La modulación de la corriente de calcio de tipo L (Ca_v1) dada por los receptores D_2 incrementa durante el desarrollo ya que reduce la ICa^{2+} de un 25% en la etapa PD14 a un 80% en la etapa PD40.

5. La modulación ejercida por los receptores D_2 sobre los canales de calcio Ca_v2 cambia de blanco: de recaer sobre los canales de tipo N en la etapa PD14, pasa a recaer sobre los canales de tipo P/Q en la etapa PD40.

6. La modulación presináptica dependiente del receptor D_2 recae sobre canales de tipo N en la etapa PD14, pero su mecanismo de señalización cambia de efector, hacia los canales de tipo P/Q en la etapa PD40.

7. Una de las funciones del receptor D_2 es el de revertir la respuesta de los receptores D_1 .

8. La calcineurina (PP-2B) juega un papel importante en el efecto predominante del receptor D_2 sobre las acciones del receptor D_1 en la modulación de las corrientes de calcio de tipo L, pues el bloqueo de la actividad de la PP-2B, permite que la activación del receptor D_1 incremente las corrientes de calcio de tipo L aun en presencia del agonista selectivo de los receptores D_2 .

BIBLIOGRAFIA

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

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

Ali AB, Nelson C. Distinct Ca²⁺ Channels Mediate Transmitter Release at Excitatory Synapses Displaying Different Dynamic Properties in Rat Neocortex. **Cereb Cortex.** 2005

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

Angulo MC, Parra P, Dieudonne S. Chick cerebellar Purkinje cells express omega-conotoxin GVIA-sensitive rather than funnel-web spider toxin-sensitive calcium channels. **Neuroscience.** 83: 1-6, 1998.

Antonopoulos J, Dori I, Dinopoulos A, Chiotelli M, Parnavelas JG. Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. **Neuroscience.** 110: 245-256, 2002.

Aperia AC. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. **Annu Rev Physiol.** 62:621-47, 2000.

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.

Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J, Albillos A, Garcia AG. SNX482 selectively blocks P/Q Ca²⁺ channels and delays the inactivation of Na⁺ channels of chromaffin cells. **Eur J Pharmacol.** 475: 11-18, 2003.

Artalejo CR, Ariano MA, Perlman RL, Fox AP. Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. **Nature.** 348: 239-242, 1990.

Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. **Ann Neurol.** 57(1):17-26, 2005.

Baas H, Fuchs G, Gemende I, Hueber R, Lachenmayer L, Schneider E, Schoenberger B, Werner M. Which factors influence therapeutic decisions in Parkinson's disease? **J Neurol.** 249 Suppl 3:III/49-52, 2002.

Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. **Nature.** 377(6548):424-428, 1995.

Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Sank CA, Bains JS. Dopamine modulates use-dependent plasticity of inhibitory synapses. **J Neurosci.** 24: 5162-71, 2004.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ. Cellular and molecular characterization of Ca²⁺ currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. **J Neurosci.** 14: 6667-6686, 1994.

Bargas J, Ayala GX, Hernandez E, Galarraga E. Ca²⁺-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. **Brain Res Bull.** 45(5):521-4, 1998.

Barral J, Poblette F, Mendoza E, Pineda JC, Galarraga E, Bargas J. High-affinity inhibition of glutamate release from corticostriatal synapses by omega-agatoxin TK. **Eur J Pharmacol.** 430(2-3):167-73, 2001.

Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. 2005. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. **Cell.** 122:261-273

Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. **J Neurosci.** 15(12):7821-36, 1995.

Bergson C, Mrzljak L, Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Levenson R. Characterization of subtype-specific antibodies to the human D5 dopamine receptor: studies in primate brain and transfected mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92(8):3468-72, 1995.

Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T. The naming of voltage-gated calcium channels. **Neuron.** 13: 505-506, 1994.

Brown NA, Seabrook GR. Phosphorylation- and voltage-dependent inhibition of neuronal calcium currents by activation of human D2(short) dopamine receptors. **Br J Pharmacol.** 115: 459-466, 1995.

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

Cardozo DL, Bean BP. Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. **J Neurophysiol.** 74: 1137-1148, 1995.

Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem.** 64: 493-531, 1995.

Catterall WA. Molecular properties of sodium and calcium channels. **J Bioenerg Biomembr.** 28: 219-230, 1996.

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

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 16:521-55, 2000.

Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90(20):9576-80, 1993.

Chesselet MF, Delfs JM. Basal ganglia and movement disorders: an update. **Trends Neurosci.** 19: 417-422, 1996.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. **Trends Neurosci.** 19: 19-24, 1996.

Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 33: 281-307, 1993.

Cooper AJ, Stanford IM. Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. **Neuropharmacology.** 41(1):62-71, 2001.

Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. **EMBO J.** 8: 4025-4034, 1989.

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.

Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT Jr, Bates MD, Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. **Nature.** 347: 72-76, 1990.

De Weille JR, Schweitz H, Maes P, Tartar A, Lazdunski M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88: 2437-2440, 1991.

Doering CJ, Zamponi GW. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. **J Bioenerg Biomembr.** 35(6):491-505, 2003.

Dohlman HG, Caron MG, DeBlasi A, Frielle T, Lefkowitz RJ. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. **Biochemistry.** 29: 2335-2342, 1990.

Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. **Trends Neurosci.** 18: 89-98, 1995.

Elezgarai I, Benitez R, Mateos JM, Lazaro E, Osorio A, Azkue JJ, Bilbao A, Lingenhoehl K, Van Der Putten H, Hampson DR, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P. Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. **J Comp Neurol.** 411(3):431-40, 1999.

Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron.** 25: 533-535, 2000.

Edvardsen O, Dahl SG. A putative model of the dopamine transporter. **Brain Res Mol Brain Res.** 27(2):265-74, 1994.

Fass DM, Takimoto K, Mains RE, Levitan ES. Tonic dopamine inhibition of L-type Ca²⁺ channel activity reduces alpha1D Ca²⁺ channel gene expression. **J Neurosci.** 19: 3345-3352, 1999.

Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Cheramy 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 J, Nestler EJ, Greengard P. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. **Science.** 281(5378):838-42, 1998.

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

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

Fraser CM, Arakawa S, McCombie WR, Venter JC. Cloning, sequence analysis, and permanent expression of a human alpha 2-adrenergic receptor in Chinese hamster ovary cells. Evidence for independent pathways of receptor coupling to adenylate cyclase attenuation and activation. **J Biol Chem.** 264: 11754-11761, 1989.

Fujita Y, Mynlieff M, Dirksen RT, Kim MS, Niidome T, Nakai J, Friedrich T, Iwabe N, Miyata T, Furuichi T. Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. **Neuron.** 10: 585-598, 1993.

Garcia L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C. Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. **J Neurosci.** 23(25):8743-51, 2003.

Gomora JC, Avila G, Cota G. Ca²⁺ current expression in pituitary melanotrophs of neonatal rats and its regulation by D2 dopamine receptors. **J Physiol.** 1;492 :763-773, 1996.

Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. **Biosci Rep.** 21(3):247-69, 2001.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. **Science.** 250(4986):1429-1432, 1990.

Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. 2002. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. **J Neurosci.** 22:5042-5054.

Gerfen CR, Keefe KA. Neostriatal dopamine receptors. **Trends Neurosci.** 17(1):2-3, 1994.

Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. **Trends Neurosci.** 15: 133-139, 1992.

Gerlach M, Double K, Arzberger T, Leblhuber F, Tatschner T, Riederer P. Dopamine receptor agonists in current clinical use: comparative dopamine receptor binding profiles defined in the human striatum. **J Neural Transm.** 110(10):1119-27, 2003.

Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annu Rev Biochem.** 56: 615-649, 1987.

Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. **Annu Rev Neurosci.** 16:299-321, 1993.

Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. **Nature.** 1989 Dec 21-28;342(6252):923-6.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature.** 379(6566):606-12, 1996.

Gomora JC, Avila G, Cota G. Ca²⁺ current expression in pituitary melanotrophs of neonatal rats and its regulation by D2 dopamine receptors. **J Physiol.** 492 :763-773, 1996.

Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, Allen PB, Fienberg A, Nishi A. The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. **Brain Res Brain Res Rev.** 26(2-3):274-84, 1998.

Greengard P, Allen PB, Nairn AC. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. **Neuron.** 23(3):435-447, 1999.

Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J. Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. **J Neurosci.** 23(26):8931-40, 2003.

Hagiwara S. Ca-dependent action potential. **Membranes.** 3:359-381, 1975.

Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. **J Neurosci.** 20: 8987-8895, 2000.

Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. **J Neurosci.** 17: 3334-3342, 1997.

Herve D, Levi-Strauss M, Marey-Semper I, Verney C, Tassin JP, Glowinski J, Girault JA. G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. **J Neurosci.** 13: 2237-2248, 1993.

Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Bruinvels A. This is not a G protein-coupled receptor. **Trends Pharmacol Sci.** 14(1):7-12, 1993.

Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. **Trends Neurosci.** 17(12):531-6, 1994.

Hille B. **Ion Channels of excitable membranes.** 3a ed. USA. Sinauer associates, Inc. Publishers. 2001.

Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. **Annu Rev Neurosci.** 17: 399-418, 1994.

Hopf FW, Cascini MG, Gordon AS, Diamond I, Bonci A. Cooperative activation of dopamine D1 and D2 receptors increases spike firing of nucleus accumbens neurons via G-protein betagamma subunits. **J Neurosci.** 23(12):5079-87, 2003.

Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T. Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. **J Neurosci.** 20: 59-65, 2000.

Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. **Pharmacol Ther.** 64: 291-370, 1994.

Jenner P. Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. **Curr Opin Neurol.** 16 Suppl 1:S3-7, 2003.

Jenkinson CP, Hanson R, Cray K, Wiedrich C, Knowler WC, Bogardus C, Baier L. Association of dopamine D2 receptor polymorphisms Ser311Cys and Taq1A with obesity or type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. **Int J Obes Relat Metab Disord.** 24(10):1233-8, 2000.

Jin LQ, Goswami S, Cai G, Zhen X, Friedman E. SKF83959 selectively regulates phosphatidylinositol-linked D1 dopamine receptors in rat brain. **J Neurochem.** 85(2):378-86, 2003.

Joel D, Weiner I. The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. **Neuroscience.** 63(2): 363-379, 1994.

Joel D, Weiner I. The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. **Brain Res Brain Res Rev.** 23: 62-78, 1997.

Jones OT, Bernstein GM, Jones EJ, Jugloff DG, Law M, Wong W, Mills LR. N-Type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex, and regional expression. **J Neurosci.** 17: 6152-6164, 1997.

Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. **Circ Res.** 87: 1095-1102, 2000.

Kalivas PW, Nakamura M. Neural systems for behavioral activation and reward. **Curr Opin Neurobiol.** 9: 223-227, 1999.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. **Trends Neurosci.** 18: 527-535, 1995.

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

Kjelsberg MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. **J Biol Chem.** 267:1430-1433, 1992.

Kochevarov AA. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. **Cell Calcium.** 33: 145-62, 2003.

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

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. **N Engl J Med.** 339: 1044-1053, 1998.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. **N Engl J Med.** 339: 1130-1143, 1998.

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

Le Moine C, Tison F, Bloch B. D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. **Neurosci Lett.** 117(3):248-52, 1990.

Le Moine C, Bloch B. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. **J Comp Neurol.** 355(3):418-26, 1995.

Liu Y, Lasater EM. Calcium currents in turtle retinal ganglion cells. II. Dopamine modulation via a cyclic AMP-dependent mechanism. **J Neurophysiol.** 71: 743-752, 1994.

Llinas R, Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. **J Physiol.** 305:171-195, 1980.

Llinas R, Yarom Y. Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. **J Physiol.** 315:569-84, 1981.

Lovinger DM, Tyler E. Synaptic transmission and modulation in the neostriatum. **Int Rev Neurobiol.** 39:77-111, 1996.

Lubow RE. Construct validity of the animal latent inhibition model of selective attention deficits in schizophrenia. **Schizophr Bull.** 31(1):139-53, 2005.

Mansvelder HD, McGehee DS. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. **J Neurobiol.** 53(4):606-17, 2002.

Mansvelder HD, Lodder JC, Sons MS, Kits KS. Dopamine modulates exocytosis independent of Ca(2+) entry in melanotropic cells. **J Neurophysiol.** 87(2):793-801, 2002.

Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ. D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. **J Neurosci.** 21(7):2268-77, 2001.

Maurice N, Mercer J, Chan CS, Hernandez-Lopez S, Held J, Tkatch T, Surmeier DJ. D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na⁺ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. **J Neurosci.** 24(46):10289-301, 2004.

Mei YA, Griffon N, Buquet C, Martres MP, Vaudry H, Schwartz JC, Sokoloff P, Cazin L. Activation of dopamine D4 receptor inhibits an L-type calcium current in cerebellar granule cells. **Neuroscience.** 68: 107-16, 1995.

Mermelstein PG, Song WJ, Tkatch T, Yan Z, Surmeier DJ. Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. **J Neurosci.** 18(17):6650-61, 1998.

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

Middleton FA, Strick PL. Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. **Brain Cogn** 42:183-200, 2000.

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

Mink JW. The Basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. **Progress Neurobiol** 50:381- 425, 1996.

Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. **Nature**. 355: 827-9, 1992.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev**. 78(1):189-225, 1998.

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

Monteil A., Chemin J., Mennessier G., Berta P., Bourinet E., Nargeot J. et al. Cloning and molecular characterization of $\alpha 1G$ and $\alpha 1I$ isoforms of human T-type Ca^{2+} channels. **Biophys. J**. **76**: A408, 1999.

Murphy MB. Dopamine: a role in the pathogenesis and treatment of hypertension. **J Hum Hypertens**. 14 Suppl 1:S47-50, 2000.

Naguro I, Nagao T, Adachi-Akahane S. Ser(1901) of alpha(1C) subunit is required for the PKA-mediated enhancement of L-type Ca^{2+} channel currents but not for the negative shift of activation. **FEBS Lett**. 489(1):87-91, 2001.

Nathans J, Hogness DS. Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. **Cell**. 34(3):807-14, 1983.

Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annu Rev Neurosci**. 23:185-215, 2000.

Nishi A, Snyder GL, Greengard P. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. **J Neurosci**. 17: 8147-8155, 1997.

Nisenbaum ES, Wilson CJ. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. **J Neurosci.** 15(6):4449-63, 1995.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. **Nature.** 316: 440-443, 1985.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.** 23: S8-S19, 2000.

O'Dowd BF. Structures of dopamine receptors. **J Neurochem.** 60(3):804-16, 1993.

Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V, Cruz LJ. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science.** 230: 1338-1343, 1985.

Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ. G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels is dependent on a Shank-binding domain. **J Neurosci.** 25(5):1050-62, 2005.

Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Res Brain Res Rev.** 20: 91-127, 1995.

Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. **Brain Res Brain Res Rev.** 20: 128-154, 1995.

Parent A, Charara A, Pinault D. Single striatofugal axons arborizing in both pallidal segments and in the substantia nigra in primates. **Brain Res.** 698: 280-284, 1995.

Park SK, Nguyen MD, Fischer A, Luke MP, Affar el B, Dieffenbach PB, Tseng HC, Shi Y, Tsai LH. 2005. Par-4 links dopamine signaling and depression. **Cell** 122: 275-287.

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Vargas J. Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺ channels. **J Neurophysiol.** 93: 2507-2519, 2005.

Perez-Garci E, Vargas J, Galarraga E. The role of Ca²⁺ channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. **Neuroreport.** 14(9):1253-6, 2003.

Pfeiffer-Linn C, Lasater EM. Dopamine modulates in a differential fashion T- and L-type calcium currents in bass retinal horizontal cells. **J Gen Physiol.** 102: 277-294, 1993.

Pfeiffer-Linn CL, Lasater EM. Dopamine modulates unitary conductance of single PL-type calcium channels in Roccus chrysops retinal horizontal cells. **J Physiol.** c496: 607-616, 1996.

Pfriegeer FW, Veselovsky NS, Gottmann K, Lux HD. Pharmacological characterization of calcium currents and synaptic transmission between thalamic neurons in vitro. **J Neurosci.** 12(11):4347-57, 1992.

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. **J Neurosci.** 20(7):RC69, 2000.

Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, Starkova NN, Fienberg AA, Nairn AC, Surmeier DJ, Greengard P. A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. **Science.** 306: 698-701, 2004.

Randall A, Benham CD. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Mol Cell Neurosci.** 14(4-5):255-272, 1999.

Regehr WG, Mintz IM. Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. **Neuron.** 12: 605-613, 1994.

Richfield EK, Penney JB, Young AB. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience.** 30(3):767-777, 1989.

Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K. Ca(2+) signaling in dendritic spines. **Curr Opin Neurobiol.** 11(3):349-56, 2001.

Sabatini BL, Svoboda K. Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. **Nature.** 408(6812):589-93, 2000.

Sadile AG, Viggiano D. Is the hypodopaminergic hypothesis plausible as neural bases of ADHD? **Behav Brain Sci.** 28(3):440-1, 2005.

Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. **Curr Opin Pharmacol.** 5(1):34-41, 2005.

Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J. A reconfiguration of CaV2 Ca²⁺ channels current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol.* 94(6):3771-3787, 2005.

Selbie LA, Hill SJ. G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 19(3):87-93, 1998.

Santana LF, Chase EG, Votaw VS, Nelson MT, Greven R. Functional coupling of calcineurin and protein kinase A in mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 544: 57-69, 2002.

Scheuber A, Miles R, Poncer JC. Presynaptic Cav2.1 and Cav2.2 differentially influence release dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci.* 24:10402-10409, 2004.

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

Sealfon SC, Olanow CW. Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci.* 23: S34-40, 2000.

Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 15: 264-270, 1994.

Shigetomi S, Yamada ZO, Ishii H, Sanada H, Watanabe H, Fukuchi S. Dopaminergic activity and endorenal dopamine synthesis in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Hypertens Res.* 18 Suppl 1:S125-30, 1995.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 86: 353-387, 1998.

Sokoloff P, Schwartz JC. Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 270-275, 1995.

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

Sokoloff P, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Martres MP, Giros B, Schwartz JC. Pharmacology of human dopamine D3 receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D2 receptor. *Eur J Pharmacol.* 225: 331-337, 1992.

Stefani A, Spadoni F, Martorana A, Lavaroni F, Martella G, Sancesario G, Bernardi G. D2-mediated modulation of N-type calcium currents in rat globus

pallidus neurons following dopamine denervation. **Eur J Neurosci.** 15: 815-825, 2002.

Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, Gelernter JE, Rozmahel R, Yang YL, Israel Y. Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. **Nature.** 347:80-83, 1990.

Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. **Nature.** 350: 614-619, 1991.

Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, Dixon RA. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. **J Biol Chem.** 264: 13572-13578, 1989.

Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Rands E, Hill WS, Dixon RA. Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. **J Biol Chem.** 263: 10267-10271, 1988.

Strange PG. Subtypes of the D2 dopamine receptor. **Trends Pharmacol Sci.** 11: 357, 1990.

Strange PG. Aspects of the structure of the D2 dopamine receptor. **Trends Neurosci.** 13: 373-378, 1990.

Strange PG. Dopamine receptors in the basal ganglia: relevance to Parkinson's disease. **Mov Disord.** 8(3):263-70, 1993.

Suaud-Chagny MF, Dugast C, Chergui K, Msghina M, Gonon F. Uptake of dopamine released by impulse flow in the rat mesolimbic and striatal systems in vivo. **J Neurochem.** 65(6):2603-2611, 1995.

Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA. Are neostriatal dopamine receptors co-localized? **Trends Neurosci.** 16: 299-305, 1993.

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

Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. **Neuron.** 14: 385-97, 1995.

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

Tanaka S. Dopaminergic control of working memory and its relevance to schizophrenia: a circuit dynamics perspective. **Neuroscience**. 2005. in press.

Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Guzman JN, Galarraga E, Vargas J. Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. **J Neurophysiol**. 93: 1119-1126, 2005.

Teramoto T, Kuwada M, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y, Katayama K. A novel peptide from funnel web spider venom, omega-Aga-TK, selectively blocks, P-type calcium channels. **Biochem Biophys Res Commun**. 196: 134-140, 1993.

Teramoto T, Niidome T, Miyagawa T, Nishizawa Y, Katayama K, Sawada K. Two types of calcium channels sensitive to omega-agatoxin- TK in cultured rat hippocampal neurones. **Neuroreport**. 6: 1684-1688, 1995.

Teramoto T, Niidome T, Kimura M, Ohgoh M, Nishizawa Y, Katayama K, Mayumi T, Sawada K. A novel type of calcium channel sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat cerebral cortical neurons. **Brain Res**. 756: 225-230, 1997.

Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT Jr, Caron MG. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 88(17):7491-5, 1991.

Tobler PN, O'doherty JP, Dolan RJ, Schultz W. Human neural learning depends on reward prediction errors in the blocking paradigm. **J Neurophysiol**. 95(1):301-10, 2006.

Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Bruinvels A, Hibert M. Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. **J Med Chem**. 35: 3448-3462, 1992.

Tseng KY, O'Donnell P. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. **J Neurosci**. 24(22): 5131-9, 2004.

Tzschentke TM. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. **Prog Neurobiol**. 63: 341-320, 2001.

Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. **Nature**. 408(6809):199-203, 2000.

Viggiano D, Vallone D, Sadile A. Dysfunctions in dopamine systems and ADHD: evidence from animals and modeling. **Neural Plast**. 11(1-2):97-114, 2004.

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

Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O. 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, 1990.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev.** 24: 125-132, 2000.

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

Varadi G, Mori Y, Mikala G, Schwartz A. Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drug action. **Trends Pharmacol Sci.** 16: 43-49, 1995.

Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. **J Physiol.** 553: 169-182, 2003.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E. Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. **Neuroscience.** 95: 745-752, 2000.

Vilchis C, Bargas J, Perez-Rosello T, Salgado H, Galarraga E. Somatostatin modulates Ca²⁺ currents in neostriatal neurons. **Neuroscience.**;109(3):555-567, 2002.

Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS. The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity. **Expert Opin Ther Targets.** 6(5):601-9, 2002.

Wikstrom MA, Grillner S, El Manira A. Inhibition of N- and L-type Ca²⁺ currents by dopamine in lamprey spinal motoneurons. **Neuroreport.** 10: 3179-3183, 1999.

Williams M. E., Washburn M. S., Hans M., Urrutia A., Brust P. F., Prodanovich P. Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. **J. Neurochem.** 72: 791-799, 1999.

Wilson CJ. Basal ganglia. In **The Synaptic Organization of the Brain**, edn 5. Edited by Shepherd GM. Oxford: Oxford University Press; 361-414, 2004.

Winterer G, Weinberger DR. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. **Trends Neurosci.** 27(11):683-90, 2004.

Witcher DR, De Waard M, Campbell KP. Characterization of the purified N-type Ca²⁺ channel and the cation sensitivity of omega-conotoxin GVIA binding. **Neuropharmacology.** 32: 1127-1139, 1993.

White MG, Crumling MA, Meriney SD. Developmental changes in calcium current pharmacology and somatostatin inhibition in chick parasympathetic neurons. **J Neurosci.** 17: 6302-6313, 1997.

Wolfe SE, Howard DE, Schetz JA, Cheng CJ, Webber R, Beatty DM, Chronwall BM, Morris SJ. Dopamine D2-receptor isoforms expressed in AtT20 cells inhibit Q-type high-voltage-activated Ca²⁺ channels via a membrane-delimited pathway. **J Neurochem.** 72: 479-490, 1999.

Wong DF, Singer HS, Brandt J, Shaya E, Chen C, Brown J, Kimball AW, Gjedde A, Dannals RF, Ravert HT, Wilson PD, Wagner HN Jr. D2-like dopamine receptor density in Tourette syndrome measured by PET. **J Nucl Med.** 38(8):1243-7, 1997.

Yan Z, Song WJ, Surmeier J. 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, 1997.

Yan Z, Surmeier DJ. Muscarinic (m₂/m₄) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. **J Neurosci.** 16(8):2592-604, 1996.

Yasuda O, Morimoto S, Chen Y, Jiang B, Kimura T, Sakakibara S, Koh E, Fukuo K, Kitano S, Ogihara T. Calciseptine binding to a 1,4-dihydropyridine recognition site of the L-type calcium channel of rat synaptosomal membranes. **Biochem Biophys Res Commun.** 194: 587-594, 1993.

Yue DT, Herzig S, Marban E. Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 87: 753-757, 1990.

Zhang XF, Cooper DC, White FJ. Repeated cocaine treatment decreases whole-cell calcium current in rat nucleus accumbens neurons. **J Pharmacol Exp Ther.** 301: 1119-1125, 2002.

Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O. Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. **Nature.** 347:76-80, 1990.

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
AMPC	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
DA	Dopamina
DARP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPC (32,000 daltones)
ICa	Corrientes de calcio
IP₃	Inositol 1, 4, 5- trisfosfato
GABA	Acido- γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HVA	Alto umbral de activación
LVA	Bajo umbral de activación
NEMs	Neuronas espinosas medianas de proyección
NS	Neostriado
NST	Núcleo subtalámico
PKA	Proteína cinasa Dependiente de AMPC
PKC	Proteína cinasa C
PP-1	Proteína fosfatasa 1
PP-2A	Proteína fosfatasa 2A
PP-2B	Proteína fosfatasa 2B
PLC	Fosfolipasa C
PPH	Postpotencial hiperpolarizante
SNr	Sustancia negra reticulada
SNC	Sustancia negra compacta
scRT-PCR	Transcriptasa reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en célula única
TTX	Tetrodotoxina
ω-AgaTK	ω -agatoxina TK
ω-CgTx	ω -conotoxina GVIA