



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EL RECEPTOR DE DOPAMINA TIPO D<sub>3</sub>  
AUMENTA SU SEÑALIZACIÓN EN UN MODELO  
DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON:  
PAPEL DEL PIP<sub>2</sub> EN LA MODULACIÓN DEL  
CANAL DE Ca<sup>2+</sup> Ca<sub>v</sub>2.1

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

Gilberto Aleph Prieto Moreno



Tutor: Dr. José Bargas Díaz

MÉXICO, D. F.

Junio 2010



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 RECEPTOR DE DOPAMINA TIPO D<sub>3</sub> AUMENTA SU SEÑALIZACIÓN EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: PAPEL DEL PIP<sub>2</sub> EN LA MODULACIÓN DEL CANAL DE Ca<sup>2+</sup> Ca<sub>v</sub>2.1

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz en el Departamento de Neurociencia Cognitiva (laboratorio BL-103) de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José Bargas Díaz	IFC-Neurociencias, UNAM
Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de química, UNAM
Dr. Arturo Hernández Cruz	IFC-Neurociencias, UNAM

Los experimentos de inmunodetección tipo “Western” fueron realizados en colaboración con la Dra. Yvonne Rosenstein del Departamento de Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología (UNAM).

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Tatiana Fiordeliso y de la Biol. Exp. Marcela Palomero en los experimentos de inmunodetección y cirugía estereotáxica, respectivamente. Así como la asesoría brindada por el Dr. Antonio Laville para el análisis de las curvas concentración-respuesta.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (34815-N, 41328-Q), PAEP-UNAM (030539, 202352) e IMPULSA. Para la realización de la presente tesis, durante los estudios de doctorado gocé de becas otorgadas por CONACYT, por IMPULSA y por la Fundación Alberto y Dolores Andrade. Además. Conté con el apoyo de la DGEP, la *International Brain Research Organization* (IBRO) y del programa “León Cintra” para la asistencia a congresos nacionales e internacionales. La revista *Disease Models & Mechanisms* me otorgó un apoyo para la realización de una estancia de investigación.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 2 de julio de 2010.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia	IFC-Neurociencias, UNAM
Vocal	Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval	IIB, UNAM
Secretario	Dra. Laura Escobar Pérez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	IFC-Neurociencias, UNAM

*A*  
*Pablove*

# Índice

	Pág.
<b>1. Resumen</b>	iii
<b>2. Summary</b>	iv
<b>3. Abreviaciones</b>	v
<b>4. Introducción</b>	
4.1. Función motora	1
4.2. Ganglios basales	3
4.2.1. Modulación dopaminérgica en el neostriado	7
4.3. Receptores de dopamina	
4.3.1. Estructura	8
4.3.2. Aspectos farmacológicos	10
4.3.3. Aspectos bioquímicos	11
4.4. Receptor de dopamina tipo D <sub>3</sub>	13
4.5. Canales de Ca <sup>2+</sup>	
4.5.1. Clasificación y estructura	14
4.5.2. Modulación	17
4.6. Enfermedad de Parkinson	
4.6.1. Descripción y características	20
4.6.2. Etiología	
4.6.2.1. Factor genético	21
4.6.2.2. Factores ambientales	22
4.6.2.3. Mecanismos involucrados en la patogénesis	23
4.6.3. Tratamiento	24
4.6.4. Modelos animales de la EP	25
4.7. Supersensibilidad de los receptores de DA	28
<b>5. Justificación</b>	29
<b>6. Planteamiento del problema</b>	30
<b>7. Hipótesis y objetivos</b>	31
<b>8. Resultados</b>	
Corrientes de Ca <sup>2+</sup> expresadas en las neuronas espinosas medianas	33
Correlato electrofisiológico de la supersensibilidad D <sub>2</sub> R <sub>clase</sub>	37
Supersensibilidad del D <sub>3</sub> R	39
Mecanismos involucrados en la modulación de la corriente de Ca <sup>2+</sup> por el D <sub>3</sub> R	44

La supersensibilidad del D <sub>3</sub> R esta asociada con una modulación emergente de los canales Ca <sub>v</sub> 2.1	57
Expresión del D <sub>3</sub> R	59
<b>9. Discusión</b>	
Supersensibilidad del D <sub>3</sub> R	60
Hidrólisis de PIP <sub>2</sub> : un mecanismo para inhibir la corriente de Ca <sup>2+</sup>	64
Consecuencias funcionales	65
<b>10. Métodos</b>	71
Lesión unilateral de la sustancia negra compacta	
Obtención de neuronas disociadas	
Genotipificación de los ratones BAC D <sub>1</sub> -eGFP	
Registros electrofisiológicos	
Análisis de los datos	
Inmunodetección	
<b>11. Bibliografía</b>	75
<b>12. Apéndice</b>	87
<b>13. Anexo 1</b>	88

# 1. Resumen

La muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta y la consecuente disminución en los niveles cerebrales de dopamina (DA) son los rasgos característicos de la enfermedad de Parkinson. Al disminuir la concentración de DA, se presenta una supersensibilidad en los receptores dopaminérgicos de clase  $D_2$  ( $D_2R_{\text{clase}}$ ) en las neuronas de proyección del neostriado. En el presente estudio, mediante registros electrofisiológicos de fijación de voltaje en la configuración de célula entera, se estudió la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  mediada por los  $D_2R_{\text{clase}}$  en neuronas estriatales disociadas del cerebro de roedores *hemiparkinsonianos*; en estos animales, que constituyen el modelo más empleado de la enfermedad de Parkinson, se lesiona unilateralmente la sustancia negra compacta mediante la administración de la neurotoxina 6-hidroxidopamina. Se observó que la supersensibilidad de los  $D_2R_{\text{clase}}$  se ve reflejada en la modulación que ejercen estos receptores sobre la corriente de  $Ca^{2+}$ : en comparación con neuronas del lado control, la relación concentración-respuesta obtenida con el quinolorane (agonista  $D_2R$ -clase) en neuronas del lado lesionado (deficiente de DA) mostró una mayor afinidad (corrimiento de la curva hacia la izquierda) y un aumento en el efecto máximo. Con el uso de antagonistas selectivos para los receptores de los tipos  $D_2R$ ,  $D_3R$  y  $D_4R$ , se obtuvo evidencia de que, en lo referente a la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$ , el cambio más importante después de la desnervación dopaminérgica se produce en el  $D_3R$ . Los resultados mostraron un incremento en la actividad del  $D_3R$  en el lado lesionado y una modificación en su vía de señalización: además de modular los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $Ca_v1$ ) al activar a la fosfatasa PP2B, el  $D_3R$  disminuyó la apertura de los canales tipo P/Q ( $Ca_v2.1$ ) a través de una vía dependiente de la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ); esto último no fue observado en neuronas del lado control, lo que sugiere que este mecanismo se desarrolla debido al déficit de DA. En el estriado desnervado no se detectaron cambios en la expresión del  $D_3R$ ; sin embargo, se observó una disminución en la expresión de la variante alternativa  $D_3\text{nf}$ . En conjunto, los resultados sugieren que la señalización mediada por el  $PIP_2$  está relacionada con la supersensibilidad del  $D_3R$ . Debido a que el blanco de estas señales son los canales  $Ca_v2.1$ , involucrados en la liberación del neurotransmisor ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) de las terminales sinápticas de las neuronas del neostriado, las modificaciones descritas del  $D_3R$  podrían atenuar la inhibición colateral entre las neuronas estriatales. De esta manera, la supersensibilidad del  $D_3R$  tendría una influencia profunda sobre el funcionamiento del circuito estriatal.

---

## 2. Summary

---

The loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra compacta followed by striatal dopamine (DA) depletion is a hallmark of Parkinson's disease. After DA depletion, dopaminergic D<sub>2</sub>-receptor class (D<sub>2</sub>R-class) supersensitivity develops in striatal neurons. Pharmacological, biochemical and behavioral data have documented this phenomenon, but clear electrophysiological-functional correlates are still lacking. In this work, Ca<sup>2+</sup> current modulation by D<sub>2</sub>R-class was studied by whole-cell voltage-clamp recordings in acutely dissociated medium spiny neurons obtained from striata of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned (*hemiparkinsonian*) rodents. It was found that Ca<sup>2+</sup> current modulation mediated by D<sub>2</sub>R-class activation reflected an enhanced sensitivity. Thus, while the concentration-response relationship (C-R plot) from control striata was fit with a two sites model, the C-R plot obtained from DA-depleted striata was fit by a three sites model, exhibited a considerable leftward shift, and presented an increased maximal response. By using selective antagonists for D<sub>2</sub>R-, D<sub>3</sub>R- and D<sub>4</sub>R-types, it was observed that the D<sub>3</sub>R-type mediated modulation was particularly enhanced. In both control and DA-depleted neurons, D<sub>3</sub>R-type modulated Ca<sub>v1</sub> channels by a PP2B-dependent signaling, but only in neurons from the 6-OHDA-lesioned striata D<sub>3</sub>R-type targeted Ca<sub>v2.1</sub> (P/Q) Ca<sup>2+</sup> channels via the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>); thus, it was hypothesized that this signaling is disclosed by DA depletion. An imbalance in the expression of D<sub>3</sub>R-type and its splice variant D<sub>3</sub>nf accompanied the enhanced D<sub>3</sub>R activity after DA depletion. On an overall, data show that PIP<sub>2</sub>-mediated signaling activated by D<sub>3</sub>R-type appeared to be linked to D<sub>2</sub>R-class supersensitivity. Because Ca<sub>v2.1</sub> (P/Q) Ca<sup>2+</sup>-channels mediate synaptic  $\gamma$ -aminobutyric (GABA) release from the terminals of striatal neurons, a reinforcement of their inhibition by D<sub>3</sub>R-type is thought to dampen the collateral inhibition among striatal neurons. Therefore, D<sub>3</sub>R-type supersensitivity could have a profound influence in the striatal circuitry.

### 3. Abreviaciones

6-OHDA, 6-hidroxidopamina  
AMPC, adenosina monofosfato cíclico  
AMS, área motora suplementaria  
BAC, *bacterial artificial chromosome*  
CaM, calmodulina  
CCDV, canales de calcio dependientes de voltaje  
D<sub>1</sub>R, receptor de dopamina tipo 1  
D<sub>2</sub>R, receptor de dopamina tipo 2  
D<sub>3</sub>R, receptor de dopamina tipo 3  
D<sub>4</sub>R, receptor de dopamina tipo 4  
D<sub>5</sub>R, receptor de dopamina tipo 5  
D<sub>1</sub>R<sub>clase</sub>, receptores de dopamina clase D<sub>1</sub> (incluye D<sub>1</sub>R y D<sub>5</sub>R)  
D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub>, receptores de dopamina clase D<sub>2</sub> (incluye D<sub>2</sub>R, D<sub>3</sub>R y D<sub>4</sub>R)  
DA, dopamina: 2-(3,4-dihidroxifenil)-etilamina  
DAG, diacilglicerol: D-1,2-diacilglicerol  
DARPP-32, *Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*, 32 kDa  
DAT, transportador de dopamina: *dopamine transporter*  
DRIPs, *dopamine receptor-interacting proteins*  
eGFP, *enhanced green fluorescent protein*  
EP, Enfermedad de Parkinson  
ERK, cinasa regulada por señales extracelulares  
GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GB, ganglios basales  
GPCR, receptor acoplado a proteínas G: *G protein-coupled receptor*  
GPe, globo pálido externo  
GPi, globo pálido interno  
GSK-3, cinasa de glicógeno sintasa-3  
IL<sub>3</sub>, asa intracelular 3: *intracellular loop 3*  
IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato: inositol-1,4,5-trifosfato  
L-DOPA, levodopa: (*S*)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-ácido propanoico  
MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
NEM, neurona espinosa mediana  
NS, no significativo ( $P > 0.05$ )  
Nst, neostriado  
PI3K, cinasa de fosfoinosítidos  
PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato  
PKA, proteína cinasa A

PKB, proteína cinasa B: Akt  
PKC, proteína cinasa C  
PKD, proteína cinasa D  
PLC $\beta$ , fosfolipasa C $\beta$   
PP2A, proteína fosfatasa 2A  
PP2B, proteína fosfatasa 2B: calcineurina  
SNc, sustancia negra pars compacta  
SNr, sustancia negra reticulata  
STN, núcleo subtalámico  
Tg, transgénico

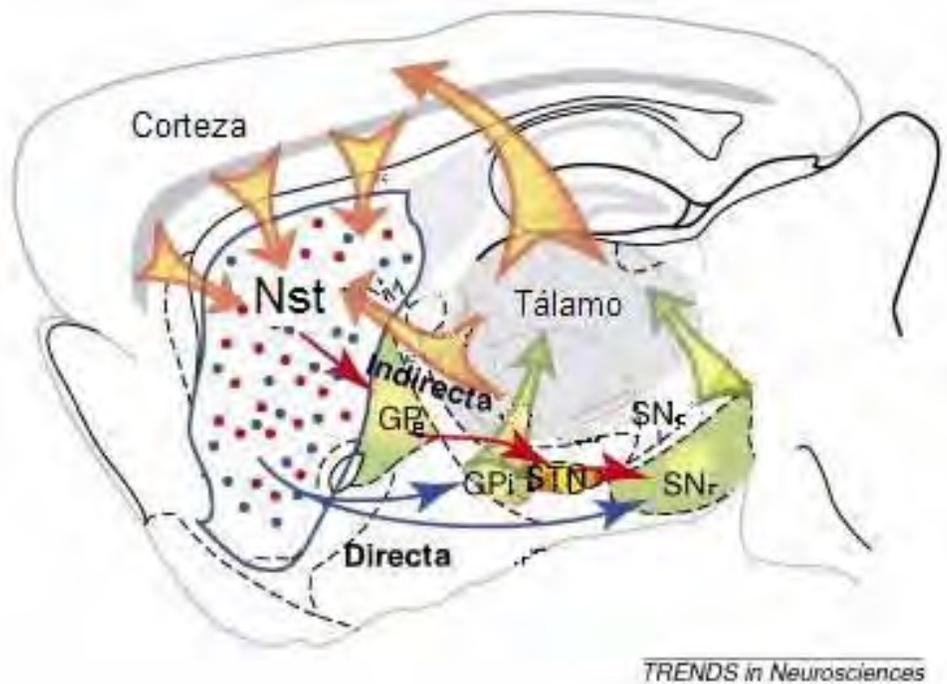
## 4. Introducción

### 4.1. Función motora

La ejecución de movimientos es de vital importancia para los animales, ya que permite una mejor interacción con el medio exterior y favorece la adaptación al mismo: el cerebro percibe estímulos físicos y a partir de estos crea representaciones del entorno, las cuales se integran para permitirle al animal dirigir una respuesta adecuada a los distintos estímulos. Estas respuestas satisfacen necesidades, protegen de estímulos nocivos o permiten alcanzar objetivos. Para todas ellas es muy probable que se involucren los movimientos, generados y controlados por el sistema motor. Gran parte de los movimientos son controlados por el cerebro a través de diferentes estructuras que participan en cada una de las etapas relacionadas con esta función: planeación, coordinación y ejecución de programas motores [1].

En la función motora participa gran parte del cerebro, sin embargo, se puede resaltar el papel de las cortezas motora, pre-motora, motora suplementaria, los ganglios basales (GB) y el cerebelo (Imagen 1). Estas cortezas cerebrales, situadas en el área prefrontal, integran información proveniente de las áreas sensoriales (e.g., somatosensorial, visual, auditiva) y de asociación del lóbulo parietal, y mantienen conexiones recíprocas con el tálamo y a través de él con el cerebelo y los GB. El procesamiento en las diferentes áreas de la corteza cerebral está involucrado en la planeación de los movimientos llamados voluntarios [1]. La coordinación y selección de los programas motores requiere de la participación de los GB, que forman parte de circuitos circulares o asas corticobasales: corteza-GB-tálamo-corteza [2]. Una vez seleccionada, la corteza motora envía la secuencia motora hacia las motoneuronas de la médula espinal, tallo y encéfalo, que a su vez comandan directamente la contracción muscular.

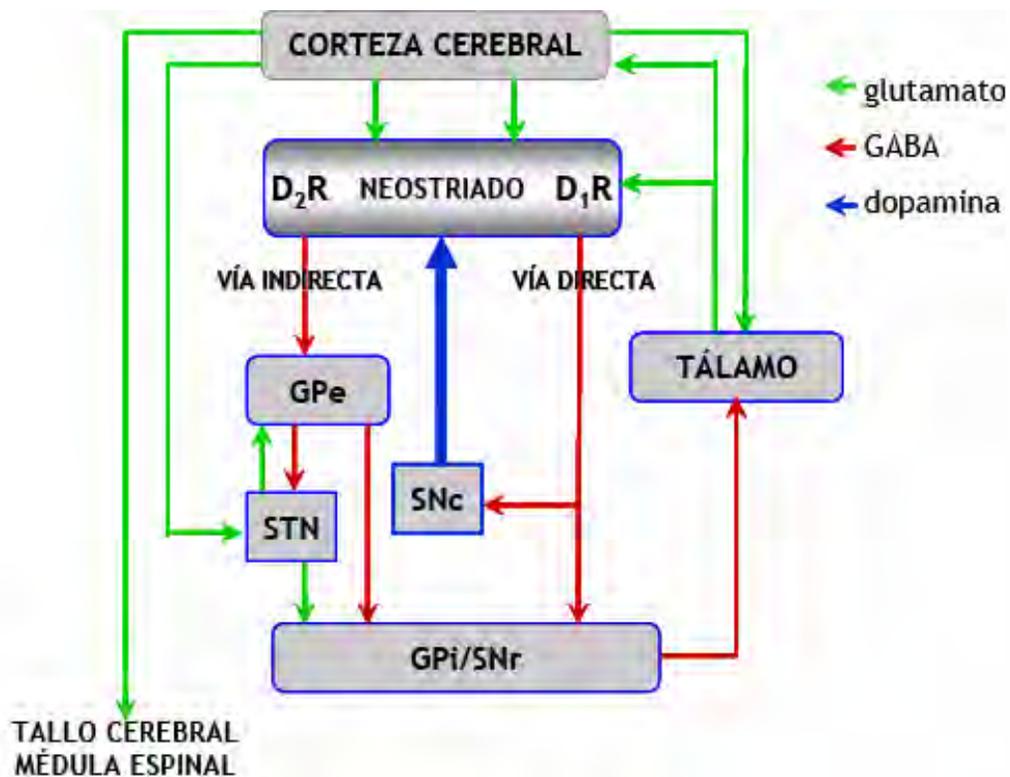
Toda la corteza cerebral envía proyecciones hacia los GB. Esta información es procesada durante su paso a través de las asas corticobasales para regresarla a las cortezas motoras (Imagen 1). Los GB integran, concentran y filtran la información de varias regiones cerebrales antes de mandarla a las cortezas motoras [1]. Así, se suprimen los movimientos no deseados, mientras se controlan la amplitud, velocidad y dirección de los movimientos necesarios, generando así, secuencias de los mismos. Esto último relaciona a los GB con el aprendizaje de rutinas motoras y de procedimientos [3]. Adicionalmente, debido a la presencia de circuitos innatos en los GB, estas estructuras cerebrales regulan el equilibrio, la postura y las expresiones faciales que son, generalmente, movimientos automáticos e involuntarios [4].



**Imagen 1. Asas corticobasales.** De manera esquemática se muestra un corte sagital de cerebro de rata. Las flechas representan el flujo de la información relacionada con la ejecución de movimientos; dicha información parte de la corteza cerebral (proyección glutamatergica, flechas naranjas), es procesada por los ganglios basales y regresa nuevamente a la corteza a través del tálamo: ciclos como éste favorecen el procesamiento de la información. La participación de los ganglios basales inicia al activarse las neuronas espinosas medianas de las vías directa e indirecta, representadas por puntos azules y rojos, respectivamente. A su vez, las flechas azules ilustran la vía directa: Nst → GPi/SNr; mientras que las flechas rojas señalan la vía indirecta: Nst → GPe → STN → SNr. Nst, neostriado; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; STN, núcleo subtalámico; SNc, sustancia negra compacta; SNr, sustancia negra reticulada. Modificado de la ref. [5].

## 4.2. Ganglios basales (GB)

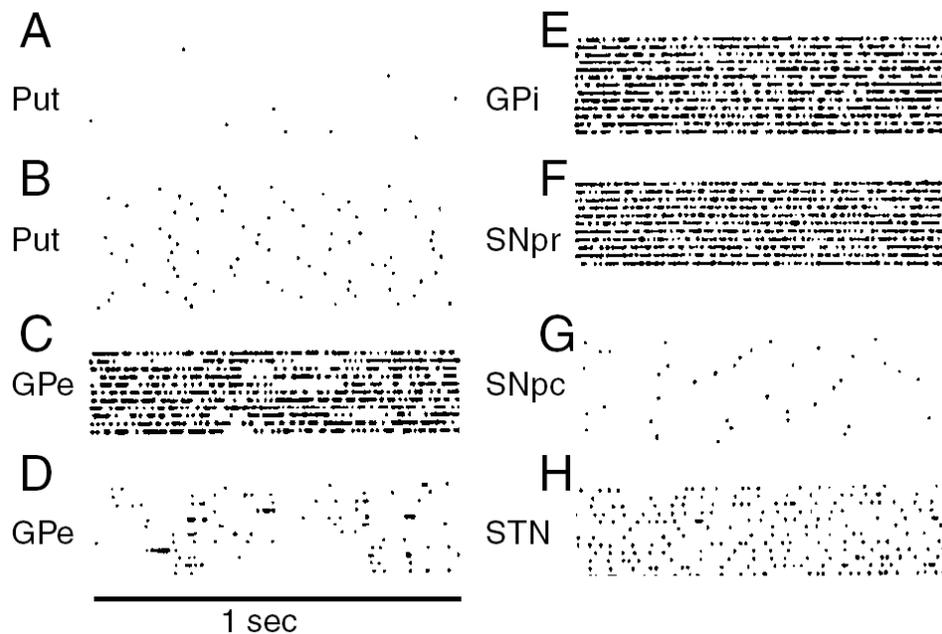
Los GB son estructuras subcorticales localizadas en el cerebro medio-anterior de los vertebrados [4]. El neostriado (Nst; caudado/putamen) es el principal núcleo de entrada de los ganglios basales, recibe aferentes de la corteza, el tálamo, los núcleos del raquí, el núcleo subtalámico (STN) y la sustancia negra compacta (SNc). A su vez proyecta hacia el globo pálido interno (GPi) y la sustancia negra reticulada (SNr), que son los núcleos de salida de los ganglios basales. Este circuito se conoce como *vía directa*. Hay otro circuito: la *vía indirecta*: aquí, las señales del Nst llegan a los núcleos de salida después de pasar por el globo pálido externo (GPe) y el STN, denominados núcleos intrínsecos [6] (Imagen 2).



**Imagen 2.** Vías directa e indirecta de los GB. Las señales que llegan al neostriado (Nst) se procesan a través de dos vías: directa e indirecta. El esquema muestra la ruta de cada una. Note que el Nst recibe inervación dopaminérgica proveniente de la sustancia negra compacta (SNc). En la vía directa, la dopamina actúa a través del D<sub>1</sub>R; mientras que en la vía indirecta su acción es resultado de la activación del D<sub>2</sub>R. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; STN, núcleo subtalámico; SNr, sustancia negra reticular.

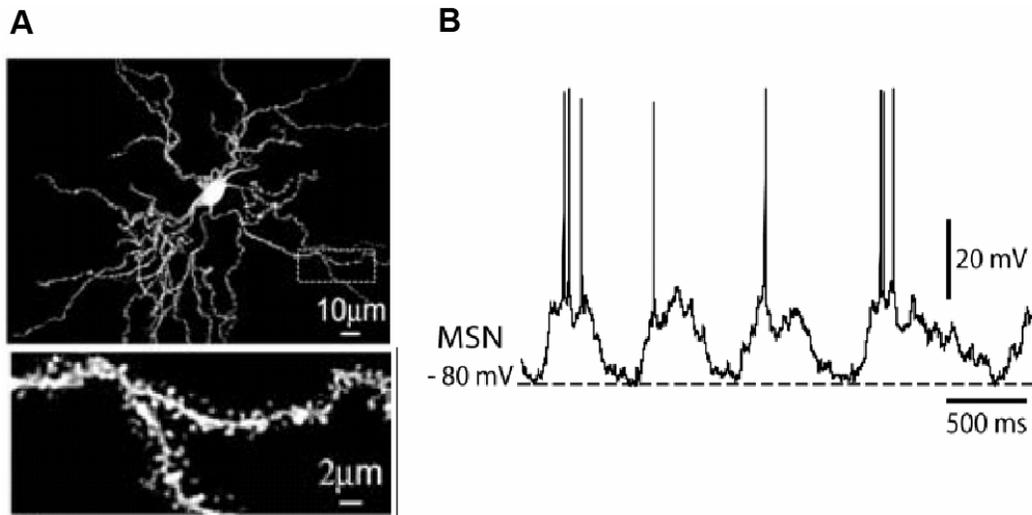
Los núcleos de salida de los GB (GPi y SNr) se encuentran disparando de manera tónica, por lo que los circuitos tálamo-corticales asociados con las cortezas motoras se encuentran reprimidos. Al activarse la *vía directa* la proyección inhibitoria de las neuronas de proyección del Nst llevan a la inhibición del GPi/SNr. Por lo tanto, se remueve la inhibición de los circuitos tálamo-corticales (doble inhibición en serie o desinhibición); lo que incrementa la actividad de las cortezas motoras y por ende facilita el movimiento.

En cambio, si se activa la *vía indirecta* se desinhibe al NST, que es excitador, y por lo tanto se activa aún más a las neuronas inhibitorias del GPi/SNr, lo que a su vez reprime más a los circuitos tálamo-corticales activadores del movimiento y así, el movimiento se suprime (ver Imágenes 2 y 3). Como puede observarse, este modelo se basa en la tasa de disparo de las neuronas y se le denomina: “*rate model*” [3,7].



**Imagen 3. Disparo de las neuronas de los diferentes núcleos que constituyen los GB.** Registros extracelulares mostrados en gráficas tipo  *raster* donde cada potencial de acción es un punto y cada línea es un registro unitario continuo de 1 seg. Cada línea corresponde a la misma neurona. El disparo es espontáneo. (A, B) Put, putamen; las neuronas son casi silentes o de disparo esporádico. (C, D) GPe, globo pálido externo. (E) GPi, globo pálido interno. (F) SNpr, sustancia negra reticular. En el GPi y la SNpr el disparo es tónico y de alta frecuencia (60-80 Hz). (G) SNpc, sustancia negra compacta. (H) STN, núcleo subtalámico; se muestra el disparo tónico (STN=20 Hz) o en ráfagas característico de estas neuronas.

A nivel celular, el Nst esta constituido principalmente (~ 90 %) por las neuronas espinosas medianas (NEMs) de proyección. Las NEMs se caracterizan por tener un diámetro somático de 10-20  $\mu\text{m}$ , dendritas con una gran cantidad de espinas y por liberar el neurotransmisor inhibidor ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) [6]. En condiciones de reposo, cuando no existe una activación múltiple (convergencia) por parte de las terminales glutamatérgicas que inervan a las NEMs, el potencial de membrana de estas neuronas se encuentra alrededor de los -85 mV, lo que se conoce como estado de reposo neuronal o estado inactivo (“*down-state*”). En respuesta a una activación glutamatérgica convergente las NEMs son despolarizadas y mantenidas en un segundo potencial de membrana alrededor de los -55 mV, cercano al umbral de disparo (aproximadamente -45 mV): el estado activo (“*up-state*”; Imagen 4) [8]. Las NEMs de la vía directa, que proyectan sus axones al GPi/SNr, expresan el neuropéptido sustancia P y el receptor de dopamina (DA) tipo 1 ( $D_1R$ ); por su parte, las NEMs de la vía indirecta, cuya conexión sináptica es con el GPe, expresan encefalinas y el receptor de DA tipo 2 ( $D_2R$ , ver Tabla 1) [6,9]. En cuanto a las propiedades electrofisiológicas, las NEMs de la vía indirecta ( $D_2R$ ) son más excitables que las de la vía directa ( $D_1R$ ); al parecer debido a diferencias en la densidad de canales de calcio en las dendritas [10], así como también en la superficie total de las mismas [11].



**Imagen 4. Neurona espinosa mediana del Nst. (A)** Tinción con biocitina que muestra el soma y las dendritas (*arriba*). Se muestra además un acercamiento para apreciar las espinas (*abajo*). Modificada de la ref. [12]. **(B)** Durante un registro de fijación de corriente realizado en una neurona espinosa mediana se observa la transición entre el estado de reposo (*down state*, - 85 mV) y el estado activado (*up-state*, - 55 mV). La transición al estado activado depende de una entrada convergente excitadora (glutamatérgica). Modificada de la ref. [8].

En el Nst se ha reportado también la presencia de tres géneros de interneuronas, que corresponden aproximadamente al 5-10 % de la población neuronal de este núcleo [13] (Tabla 1).

**Tabla 1. Neuronas estriatales<sup>1</sup>**

Tipo	%	Inmunohistoquímica <sup>2</sup>
NEM estriato-nigral	45	GABA, sustancia P
NEM estriato-palidal	45	GABA, encefalinas
Interneurona de disparo de alta frecuencia (FS, <i>fast-spiking</i> )	1.5	GABA, Parvoalbúmina
Interneurona de bajo umbral de disparo (LTS, <i>low-threshold spiking</i> )	2	GABA, somatostatina, sintasa de óxido nítrico, neuropéptido Y, calretinina
Interneurona colinérgica	0.5	Acetilcolina

<sup>1</sup>Tomada y modificada de la ref. [13].

<sup>2</sup>Se refiere a la detección de moléculas que caracterizan cada población celular

#### 4.2.1. Modulación dopaminérgica en el Nst

Los axones de las neuronas dopaminérgicas de la SNc inervan principalmente al Nst; es en este núcleo en donde se encuentra la mayor concentración de DA en el cerebro [1,6,14]. Un aspecto importante del modelo actual del funcionamiento de los GB es que incluye la participación de la DA [7]. En líneas precedentes se explicó que este modelo establece que la información es procesada de manera segregada a través de las vías *directa* (nigroestriatal) e *indirecta* (nigropalidal): la primera facilita y la segunda inhibe el movimiento. El papel de la DA, de acuerdo con el modelo, es regular las dos vías mediante la modulación del disparo de las NEMs correspondientes: Albin et al. (1989) propusieron que la activación del D<sub>1</sub>R excita a las NEMs de la vía *directa* mientras que la activación del D<sub>2</sub>R inhibe a las neuronas de la vía *indirecta*. De esta manera, la DA tiene efectos opuestos sobre la vía *directa* y la *indirecta*; sin embargo, el resultado final de la acción de la DA es un aumento en la función motora [7]. Los principios generales del modelo de los GB fueron respaldados posteriormente, al dilucidarse que la activación de los receptores de DA excita o inhibe a las NEMs mediante la modulación de canales de calcio de los que depende el disparo neuronal: los canales Cav1 o de tipo L. Los receptores D<sub>1</sub> facilitan la apertura de los canales Cav1, mientras que los receptores D<sub>2</sub> inhiben este proceso [15,16]. Otros tipos de canal de calcio presentes en estas neuronas, los Cav2 (N, P-Q y R), tienen otras funciones: regular el patrón temporal de disparo y la liberación de neurotransmisor de las terminales [17,18]. A través de estas acciones la DA altera la manera en que las NEMs responden a las señales glutamatérgicas, provenientes de la corteza o el tálamo.

El axón principal de las NEMs deja colaterales axónicas dentro del Nst [19]. Como consecuencia, la actividad de las NEMs es también regulada por la inervación GABAérgica proveniente de las mismas NEMs. Estas sinapsis dan origen a la inhibición lateral y son moduladas por la DA: la activación de los D<sub>1</sub>R<sub>clase</sub> aumentan la transmisión GABAérgica entre NEMs, mientras que las acciones de los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> disminuyen este proceso [20,21]. La

inhibición lateral se ha propuesto como un mecanismo para explicar el funcionamiento de los GB, ya que plantea que la competencia entre grupos de neuronas permitiría filtrar, escoger o cambiar los programas motores.

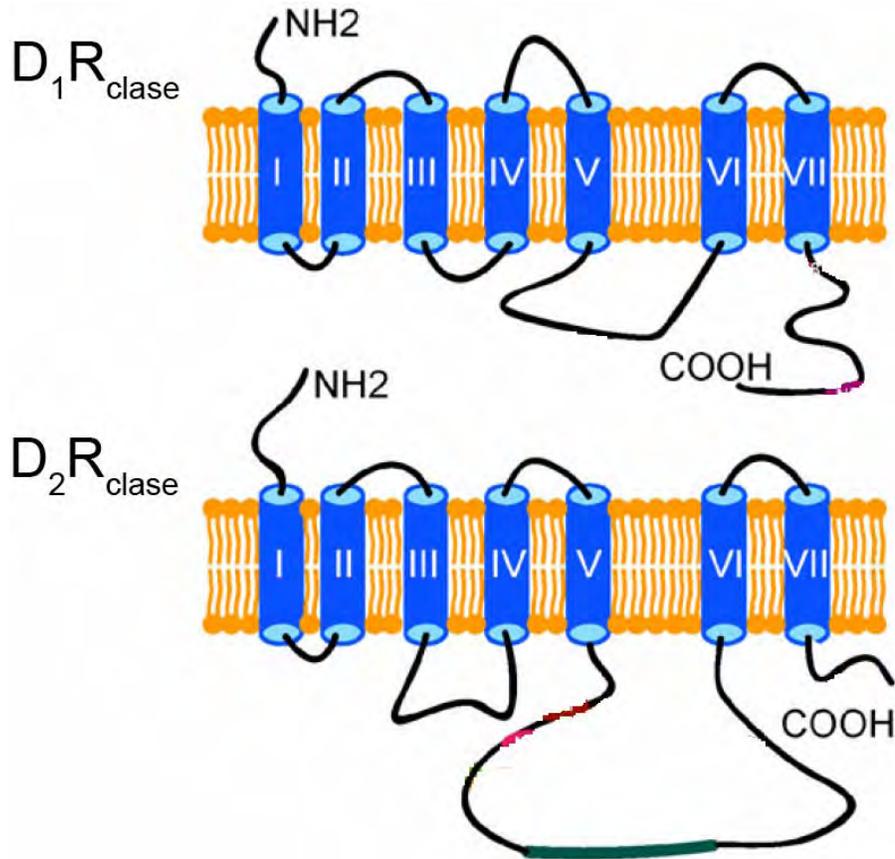
En el caso de la sinapsis corticoestriatal, la DA induce potenciación de largo plazo (LTP, *long-term potentiation*) al activar a los  $D_1R_{\text{clase}}$  presentes en las neuronas de la *vía directa*, mientras que la activación de los  $D_2R$  en las neuronas de la *vía indirecta* induce depresión de largo plazo (LTD, *long-term depression*) [22].

### 4.3. Receptores de dopamina

#### 4.3.1. Estructura

Los receptores de DA pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales que transducen sus señales a través de proteínas G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*). En mamíferos se han identificado cinco receptores para DA; los cuales, con base en sus características estructurales, bioquímicas y farmacológicas, se agrupan en dos clases: los receptores tipo 1 ( $D_1R$ ) y tipo 5 ( $D_5R$  o  $D_{1b}R$ ) pertenecen a la clase 1 ( $D_1R_{\text{clase}}$ ); mientras que los receptores tipo 2 ( $D_2R$ ), tipo 3 ( $D_3R$ ) y tipo 4 ( $D_4R$ ) conforman la clase 2 ( $D_2R_{\text{clase}}$ ) [23,24]. En los cinco tipos de receptor se han identificado sitios consenso de *N*-glicosilación. Una diferencia notable entre los  $D_1R_{\text{clase}}$  y los  $D_2R_{\text{clase}}$  es la longitud de sus segmentos intracelulares: en los  $D_1R_{\text{clase}}$  el asa intracelular 3 ( $IL_3$ , *intracellular loop*) es corta y el segmento final del extremo carboxilo es largo; lo contrario sucede en los  $D_2R_{\text{clase}}$ , que tienen una  $IL_3$  larga y un extremo carboxilo corto (Imagen 5; [25]). Recientemente se ha sugerido que estas diferencias podrían influir en su interacción con otras proteínas, como las DRIPs (*DA receptor-interacting proteins*), y de esta manera determinarían su ensamblaje en complejos macromoleculares [25]. En última instancia estas interacciones están relacionadas

con la señalización y el tráfico intracelular de los receptores (*e.g.* transporte a la membrana e internalización), de aquí su importancia.



**Imagen 5. Receptores de dopamina.** El esquema ilustra la topología de los receptores de dopamina clase 1 (*arriba*) y clase 2 (*abajo*). Los siete dominios transmembranales se ilustran en azul y se identifican con números romanos. Note las diferencias en la longitud de la asa intracelular 3 ( $IL_3$ ) y del extremo carboxilo. La interacción con proteínas intracelulares tiene lugar preferentemente en estas regiones. Modificada de la ref. [25].

En los cromosomas humanos, los genes correspondientes a los receptores  $D_1$  a  $D_5$  se localizan en las regiones 5q, 11q, 3q, 11p y 4p, respectivamente. A diferencia de los genes de los  $D_1R_{\text{clase}}$  que no contienen intrones, los genes correspondientes a los receptores tipo  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$  tienen seis, cinco y cuatro intrones, respectivamente. La presencia de intrones dentro de la región codificante del gene lleva a la generación de variantes de estos receptores. Del  $D_2R$

predominan dos variantes, llamadas corta ( $D_{2s}R$ ) y larga ( $D_{2L}R$ ), que son generadas por una edición postranscripcional (*alternative splicing*) que remueve 87 pb entre los intrones 4 y 5 [23]. La diferencia entre estas variantes se encuentra en la longitud de su  $IL_3$  (ver Imagen 5). En el caso del  $D_3R$  se han reportado siete variantes producto de *splicing* alternativo. En paralelo a lo que ocurre con el  $D_2R$ , existe una variante corta ( $D_{3s}R$ ) y una larga ( $D_{3L}R$ ), debido a la remoción de 21 aminoácidos del  $IL_3$ . Estas dos isoformas tienen una alta afinidad por la DA. Por el contrario, las otras cinco variantes del  $D_3R$  no unen DA y se ha propuesto que podrían regular la dimerización de este receptor [26]. De estas variantes, la  $D_{3nf}$  es la mejor caracterizada: ésta es el resultado de la pérdida de 98 pb en el tercer dominio intracelular; lo anterior causa un corrimiento en el marco de lectura, la creación de una secuencia de 55 aminoácidos diferentes a los originales y la aparición de un codón de *PARO* prematuro [27,28].

#### 4.3.2. Aspectos farmacológicos

Los perfiles farmacológicos de los  $D_1R_{clase}$  y los  $D_2R_{clase}$  difieren sustancialmente. Por ejemplo, la afinidad del agonista  $D_1R_{clase}$  SKF 38393 por los receptores  $D_1$  y  $D_5$  es  $<1$  nM mientras que para los  $D_2R_{clase}$  es  $>5$   $\mu$ M; el caso contrario se observa con la apomorfina y la bromocriptina, dos agonistas para los  $D_2R_{clase}$  [23]. Por mucho tiempo únicamente se dispuso de compuestos sintéticos (agonistas y antagonistas) que distinguían entre las dos clases de receptores de DA, pero que no actuaban de manera selectiva con alguno de los tipos de receptor. En consecuencia, gran parte de la evidencia que se tiene acerca de los efectos de la DA ha sido asociada de manera gruesa a los  $D_1R_{clase}$  o a los  $D_2R_{clase}$ . En años recientes se han sintetizado agonistas y antagonistas selectivos para diferentes tipos de  $D_2R_{clase}$ : agonistas selectivos para el  $D_3R$  son el PD128907 y el 7-OH-DPAT [29]; antagonistas selectivos para este receptor incluyen al U-99194A, nafadotride y S33138 (Tabla 2) [30,31]. Entre los antagonistas selectivos para el  $D_2R$  y el  $D_4R$  destacan el L-741,626 y el L-750,667, respectivamente [32,33]. La Tabla 2 muestra la afinidad de compuestos que presentan

selectividad para los receptores de DA clase 2. En general, la afinidad por la DA es mayor en los  $D_2R_{\text{clase}}$  ( $< 0.5 \mu\text{M}$ ) que en los  $D_1R_{\text{clase}}$  ( $> 0.5 \mu\text{M}$ ) [23]. Al comparar los tipos de receptor de la clase 2 el más afín por la DA es el  $D_3R$  [33,34].

Tabla 2. Ligandos selectivos para los receptores de dopamina clase 2

		Afinidad <sup>1,2</sup> (nM)		
Compuesto		D <sub>2</sub> R	D <sub>3</sub> R	D <sub>4</sub> R
agonistas <sup>1</sup>	<i>Dopamina</i>	474±33 <sup>a</sup>	25±3 <sup>a</sup>	92±27 <sup>b</sup>
	<i>Apomorfina</i>	24±2 <sup>a</sup>	20±3 <sup>a</sup>	ND
	<i>Quinelorane</i>	25.1 <sup>c</sup>	1.0 <sup>c</sup>	50.1 <sup>c</sup>
	<i>Quinpirole</i>	576±47 <sup>a</sup>	5.1±0.3 <sup>a</sup>	100±50 <sup>b</sup>
	<i>PD128907</i>	2511 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	5011 <sup>c</sup>
	<i>7-OH-DPAT</i>	100 <sup>c</sup>	2.5 <sup>c</sup>	1000 <sup>c</sup>
	antagonistas <sup>2</sup>	<i>Haloperidol</i>	0.45±0.03 <sup>a</sup>	9.8±0.3 <sup>a</sup>
<i>(+) Sulpiride</i>		85±7 <sup>a</sup>	422±19 <sup>a</sup>	2200±600 <sup>b</sup>
<i>Raclopride</i>		1.8±0.1 <sup>a</sup>	3.5±0.3 <sup>a</sup>	5070±730 <sup>d</sup>
<i>Nafadotride</i>		5.0 <sup>c</sup>	0.79 <sup>c</sup>	ND
<i>S33138</i>		63.1 <sup>c</sup>	2.0 <sup>c</sup>	ND
<i>L-741,626</i>		2.4 <sup>f</sup>	100 <sup>f</sup>	220 <sup>f</sup>
<i>U99194A</i>		2281±437 <sup>a</sup>	223±84 <sup>a</sup>	ND
<i>L-750,667</i>		>1700 <sup>b,f</sup>	>4500 <sup>b,f</sup>	0.51±0.7 <sup>b,f</sup>

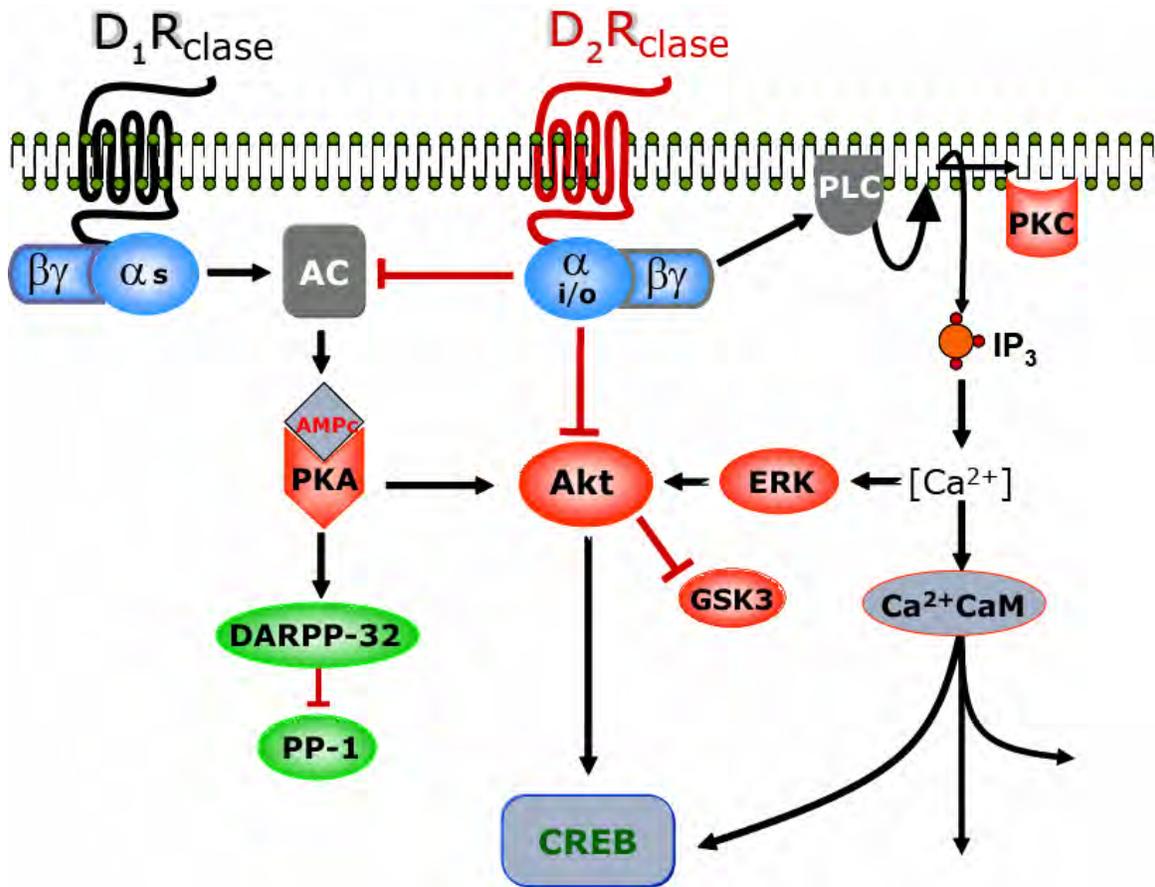
<sup>1</sup>Kd; <sup>2</sup>Ki; ND, no determinado. Tomados de la referencias <sup>a</sup>[34]; <sup>b</sup>[33]; <sup>c</sup>[35]; <sup>d</sup>[36]; <sup>e</sup>[31]; <sup>f</sup>[32].

#### 4.3.3. Aspectos bioquímicos

Los  $D_1R_{\text{clase}}$  transducen sus señales mediante la activación de proteínas G con subunidades  $\alpha_{s/olf}$  [23] que modulan positivamente a la ciclase de adenilato y elevan la concentración intracelular de AMPc [37]; por el contrario, los  $D_2R_{\text{clase}}$  están acoplados a proteínas  $G\alpha_{i/o}$ , que inhiben a la ciclase de adenilato [37] y activan a la fosfolipasa C tipo  $\beta$  (PLC $\beta$ ) [16]. Consecuentemente los  $D_1R_{\text{clase}}$  activan, mientras que los  $D_2R_{\text{clase}}$  inhiben a la

cinasa PKA. Así, en NEMs los D<sub>1</sub>R<sub>clase</sub> facilitan la activación de los canales Cav1 [15] y los receptores sinápticos de NMDA mediante la vía PKA/DARPP-32 (*Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*, 32 kDa)/PP1 (*Protein Phosphatase 1*) [38]. La activación de PKA por los D<sub>1</sub>R<sub>clase</sub> también aumenta la fosforilación (activación) de CREB (*cAMP response element binding protein*), esto mediante un mecanismo molecular basado en la activación de la cinasa Akt (pAkt<sup>Treo308</sup>) por una vía independiente de la cinasa de fosfoinosítidos PI3K [39]. Las señales generadas por los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> también activan Akt, pero a través de un mecanismo que involucra a la cinasa ERK y que no lleva a la fosforilación de CREB [39]. No obstante, CREB es activado por los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> a través de una vía de señalización diferente, que involucra la participación conjunta de PKC y CAMK (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase*) [40]. La modulación de la vía de las MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) y de CREB impacta directamente la expresión genética y puede entonces tener efectos que influyen en la plasticidad sináptica de largo plazo.

En tejido estriatal, la activación de los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> lleva a la formación de un complejo macromolecular que incluye a la β-arrestina, la fosfatasa PP2A y la cinasa Akt; la PP2A desfosforila (inactiva) a Akt y esto aumenta los niveles de GSK-3 desfosforilada (activa) [41]. La inhibición farmacológica de la GSK-3 (con litio [42], alsterpaulona o SB216763) bloquea la respuesta motriz en el ratón deficiente (*knock out*) del transportador de DA (DAT) y en un ratón tratado con anfetamina [43]. Esto muestra que, bajo ciertas condiciones, la participación de los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> en la función motora podría estar relacionada con la activación de la cinasa GSK-3.



**Imagen 6.** Vías de señalización activadas por los receptores  $D_1R_{clase}$  y  $D_2R_{clase}$ . Se observa que los efectos de los  $D_1R_{clase}$  y  $D_2R_{clase}$  son antagónicos (activación de PKA y Akt), pero en algunos casos pueden convergir (activación de factor de transcripción CREB). AC, ciclasa de adenilato;  $IP_3$ , inositol trifosfato;  $Ca^{2+}/CaM$ , calmodulina dependiente de  $Ca^{2+}$  (ver texto).

#### 4.4. Receptor de dopamina tipo $D_3$

Debido a que los hallazgos del presente trabajo de tesis resaltan el papel del  $D_3R$  en la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$ , en este apartado se revisa brevemente algunas características de este receptor. El  $D_3R$  de rata fue clonado por Sokoloff et al. (1990) mediante una estrategia de búsqueda por homología usando la secuencia del  $D_2R$  [34]. Poco después fue clonado el  $D_3R$  de origen humano [44]. En rata, el  $D_3R$  está constituido de 446 aminoácidos y presenta una alta homología con el  $D_2R$  (52% en total, 75% en la región transmembranal) [34]; la divergencia se presenta principalmente en el  $IL_3$ , y se ha propuesto

que esta región le confiere al D<sub>3</sub>R su señalización característica y su mayor afinidad por la DA [ver Tabla 2 y ref. [45]]. Por ejemplo, la unión de DA en presencia de altas concentraciones de nucleótidos de guanina (GTP) sugiere que el D<sub>3</sub>R se asocia débilmente con la subunidad G<sub>iα</sub> [46]. La diferencia en el acople con la subunidad G<sub>iα</sub> entre el D<sub>3</sub>R y el D<sub>2</sub>R podría estar relacionada con el mecanismo de activación de la vía MAPK/ERK usado por cada receptor: el D<sub>2</sub>R activa ERK a través de una vía dependiente de la G<sub>iα</sub>, mientras que el mecanismo utilizado por el D<sub>3</sub>R depende de las subunidades G<sub>βγ</sub> [47].

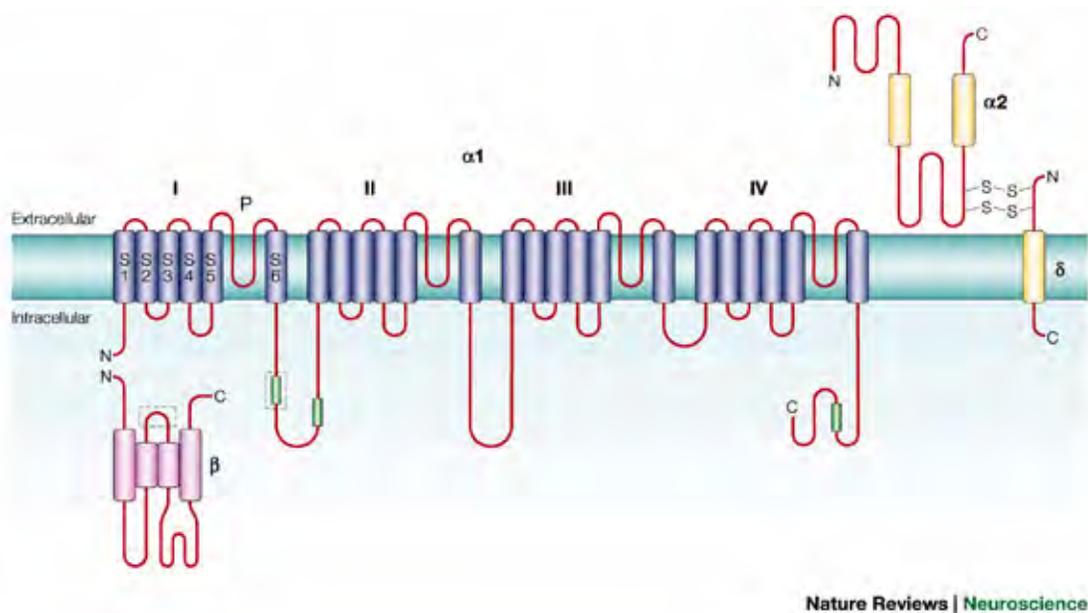
En el cerebro, el RNAm del D<sub>3</sub>R fue originalmente detectado en regiones asociadas con procesos cognitivos y en el sistema límbico: núcleo *accumbens*, islas de Calleja, tubérculo olfativo, hipocampo, corteza prefrontal e hipotálamo; niveles menores fueron también detectados en el neocórtex [34]. Además, el D<sub>3</sub>R se expresa en las neuronas dopaminérgicas de la SNc y el área tegmental ventral (VTA) [34,48]. En general, la localización del D<sub>3</sub>R mediante el uso de agonistas radioactivos ha mostrado resultados similares a los estudios que detectan el RNAm de este receptor [49]. En roedores el D<sub>3</sub>R es detectable desde el día ~12 embrionario en la eminencia ganglionar y en el neuroepitelio de la pared cerebral dorsal [49,50]. Después del nacimiento, la expresión del D<sub>3</sub>R incrementa progresivamente en el estriado, núcleo *accumbens* y corteza cerebral [50-53]. Se ha sugerido que dicho incremento es mediado por el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) [52].

## 4.5. Canales de Ca<sup>2+</sup>

### 4.5.1. Clasificación y estructura

La comunicación entre las neuronas depende fundamentalmente de dos procesos: la generación del potencial de acción, que permite la propagación de la señal eléctrica a lo largo de los axones de las neuronas; y la liberación de neurotransmisores, que a su vez hace posible

el paso de información de una neurona a otra (sinapsis química). Al participar en ambos fenómenos, los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) presentes en la membrana celular son cruciales en el funcionamiento de los circuitos neuronales. Estructuralmente, los CCDV son complejos heteromultiméricos formados por una subunidad principal ( $\alpha 1$ ) que forma el poro hidrofílico y subunidades accesorias:  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha 2\delta$  (ver Imagen 7). La subunidad  $\alpha 1$  (190-250 kDa) está constituida por cuatro dominios homólogos, cada uno compuesto de seis hélices transmembranales (S1-S6). El segmento S4 actúa como un sensor de voltaje ya que rota por la influencia de campos eléctricos generando un cambio conformacional que abre el poro del canal; este último se forma por el asa que une a los segmentos S5 y S6 de cada dominio, que contiene residuos de glutamato que determinan la selectividad del canal. Por su parte, las subunidades accesorias regulan las propiedades biofísicas (*e.g.* la dependencia al voltaje, la amplitud de la corriente y la cinética de activación) y el transporte de la subunidad  $\alpha 1$  hacia la membrana celular [54].



**Imagen 7. Estructura de los CCDV.** La subunidad  $\alpha 1$  está constituida por cuatro dominios homólogos (ver texto). La subunidad  $\beta$  (~55 kDa) es citoplásmica. En el dímero  $\alpha 2\delta$  (~170 kDa) la subunidad  $\delta$  está unida a la membrana a través de un segmento transmembranal mientras que la sección  $\alpha 2$  se localiza en el lado extracelular; el dímero es formado por un puente disulfuro. Tomado de la ref.[55].

Dependiendo del voltaje al que ocurre la apertura de los CCDV, estos se clasifican en dos grupos: el primero constituido por los canales que se activan a voltajes más despolarizados (*HVA* o *high voltage activated*: familias  $Ca_v1$  y  $Ca_v2$ ; tipos L, N, P, Q y R), que permiten el flujo de iones a partir de los -20 mV aproximadamente. El segundo grupo lo conforman los canales que se activan a voltajes menos despolarizados (*LVA* o *low voltage activated*:  $Ca_v3$  o canales de tipo T), aproximadamente entre los -70 y -50 mV, dependiendo de la célula. Actualmente la nomenclatura de los canales de  $Ca^{2+}$  toma en cuenta la subunidad  $\alpha1$  que los conforma (ver Tabla 3). Sin embargo, hay que hacer mención de una excepción a lo dicho anteriormente, los canales L del subtipo D ( $Ca_v1.3$ ) se activan alrededor de los -50 mV o menos, son comunes en las dendritas y cuando están presentes en las neuronas afectan la generación de potenciales de acción, pues en muchos casos sus voltajes de activación son similares a los de la corriente de sodio [56]. Junto con los canales NMDA, los canales  $Ca_v1.3$  pueden producir regiones de conductancia negativa en la función corriente-voltaje provocando bi-estabilidad y la facilitación del paso del estado inactivo (*down-state*) al estado activo (*up-state*) en las neuronas [17,57]. Estos canales, de los cuales depende la función entrada-salida (frecuencia-intensidad o I/O) de muchas neuronas [17] son un blanco preferido de la modulación dopaminérgica en condiciones normales, considerándosele el principal mecanismo mediante el cual la DA regula la excitabilidad neuronal.

Tabla 3. Nomenclatura de los canales de calcio dependientes de voltaje<sup>1</sup>

Superfamilia	Familia	Subunidad $\alpha 1$	Nombre	Bloqueadores
HVA	L	$\alpha 1C$	$Cav1.2$	Dihidropiridinas (DHP)
		$\alpha 1D$	$Cav1.3^*$	
		$\alpha 1F$	$Cav1.4$	
		$\alpha 1S$	$Cav1.1$	
	N	$\alpha 1B$	$Cav2.2$	$\omega$ -conotoxina GVIA
	P/Q	$\alpha 1A$	$Cav2.1$	$\omega$ -agatoxina TK
	R	$\alpha 1E$	$Cav2.3$	SNX 482**
LVA	T	$\alpha 1G$	$Cav3.1$	Kurtoxina**
		$\alpha 1H$	$Cav3.2$	
		$\alpha 1I$	$Cav3.3$	

<sup>1</sup>Modificada de la ref. [58].

\* Se activa a voltajes más hiperpolarizados ( $\sim -50$  mV).

\*\* Baja selectividad.

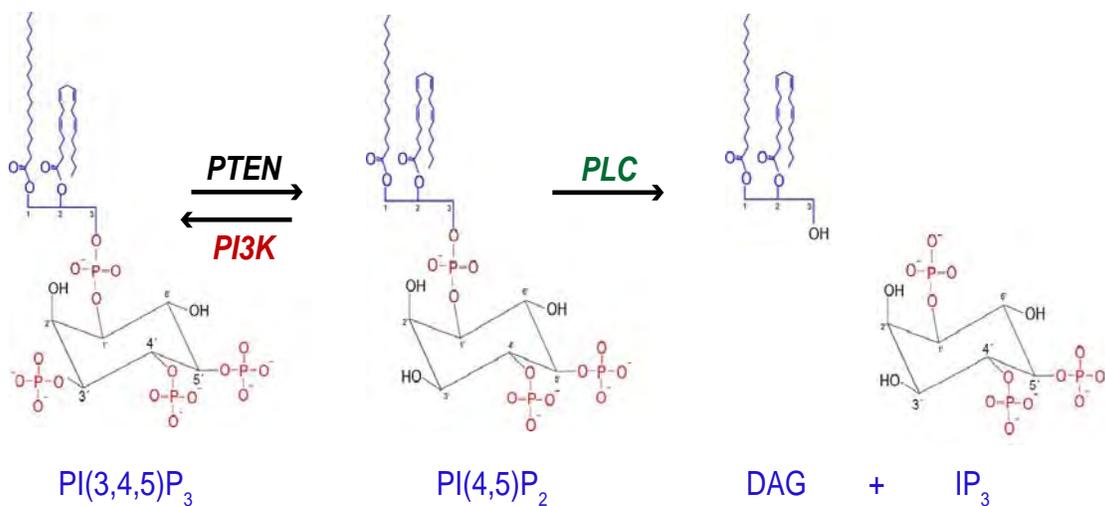
#### 4.5.2. Modulación

Los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, P/Q y R pueden modularse como resultado de su interacción directa con las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  de la proteína G heterotrimérica, las cuales se separan de la subunidad  $G_{\alpha}$  una vez que el ligando se une a un determinado GPCR. Este tipo de modulación ocurre rápidamente, es mediada por proteínas  $G_{i/o}$  (sensible a toxina *pertussis*, PTX) y no requiere de agentes difusibles intracelulares (*delimitada a membrana*). De manera importante, la reducción de la corriente por un mecanismo delimitado a membrana es dependiente de voltaje, y es más evidente a potenciales hiperpolarizados [59]. En interneuronas colinérgicas [60] del Nst, la activación de receptores muscarínicos inhibe a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo N y P/Q mediante un mecanismo delimitado a membrana.

La probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  también es modulada por procesos de fosforilación y desfosforilación, catalizados por proteínas cinasas y fosfatasas, respectivamente. Así, estos mecanismos dependen de la activación de vías de señalización intracelulares. Resumiendo lo mencionado más arriba: la activación de la vía PKA/DARPP-32/PP1 (*Protein Phosphatase 1*) por los  $\text{D}_1\text{R}_{\text{clase}}$  facilita la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo  $\text{Cav}1$  (L) en NEMs [15]. Mientras que la supresión de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por estos canales está dada por la activación de receptores  $\text{D}_2$ , que activan la vía de señalización PLC/diacilglicerol (DAG)/inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ )/PKC/CaM- $\text{Ca}^{2+}$ /PP2B (*Protein Phosphatase 2B*) [16]. Debido a la influencia de los canales  $\text{Cav}1.3$  sobre la función I/O, los  $\text{D}_1\text{R}_{\text{clase}}$  incrementan mientras que los  $\text{D}_2\text{R}_{\text{clase}}$  disminuyen la frecuencia de disparo. Este mecanismo explica el por qué la DA facilita la vía directa y reprime la indirecta.

Recientemente se ha descrito que cambios en la concentración de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $\text{PI}[4,5]\text{P}_2$ ,  $\text{PIP}_2$ ) influyen en la probabilidad de apertura de una gran variedad de canales iónicos, entre ellos los CCDV [61,62]. El  $\text{PIP}_2$  es un fosfoinosítido que constituye aproximadamente el 4-5% de todos los fosfolípidos de la membrana plasmática [63]. Tanto en sistemas de expresión heteróloga como en neuronas, se ha observado que la conductancia de los canales  $\text{Cav}2.1$  (P/Q) disminuye cuando se reducen los niveles de  $\text{PIP}_2$  de la membrana. Lo anterior se consigue por la activación de la PLC o mediante el secuestro del  $\text{PIP}_2$  por anticuerpos [64]. Al reconstituirse los niveles de  $\text{PIP}_2$ , por cinasas de fosfoinosítidos [65] o mediante la adición de  $\text{PIP}_2$  20  $\mu\text{M}$  [64], la conductancia vuelve a su valor original. Esto es, la composición de la membrana lipídica afecta directamente la función de los canales iónicos. Observaciones similares en diferentes tipos de canal iónico han sugerido que la interacción física entre la cabeza polar del  $\text{PIP}_2$  (cargada negativamente a pH fisiológico) y una “canasta” formada por aminoácidos básicos en la región C-terminal del canal, cercana al segmento S6 y a la compuerta, atrae esta región hacia la membrana; lo que crea una tensión que favorece o hace más permisiva la apertura de la compuerta del canal [62].

Los niveles de PIP<sub>2</sub> se regulan básicamente mediante mecanismos de hidrólisis, fosforilación y desfosforilación (ver Imagen 8). La composición de la membrana cambia todo el tiempo en virtud de la actividad de varias enzimas intracelulares. La disminución de los niveles de PIP<sub>2</sub> membranaral puede llevarse a cabo por la PLC (β ó γ), dando lugar a dos moléculas: el diacilglicerol que permanece anclado a la membrana, e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que difunde al citosol. Ambas moléculas actúan como segundos mensajeros. La concentración de PIP<sub>2</sub> también puede disminuir por desfosforilación, catalizada por fosfatasas específicas, o por fosforilación, catalizada por la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI3K) que lo transforma en PIP<sub>3</sub>. Mecanismos opuestos aumentan los niveles membranales de PIP<sub>2</sub>. Puede regenerarse a partir de PIP<sub>3</sub> por la acción de la fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), o a partir de fosfatidilinositol mediante la fosforilación de las posiciones 4 y 5 del anillo de inositol en reacciones catalizadas por las enzimas PI4K y PI(4)P5K, respectivamente [63].



**Imagen 8. Mecanismos bioquímicos que regulan los niveles de PIP<sub>2</sub> [PI(4,5)P<sub>2</sub>] en la membrana.** PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; PI3K, cinasa de 3-fosfatidilinositol; PI[3,4,5]P, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PI[4,5]P<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5-trifosfato; Basada en datos de la Ref. [63].

## 4.6. Enfermedad de Parkinson

### 4.6.1. Descripción y características

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por el médico británico James Parkinson en 1817. En el ensayo original (*An Essay on the Shaking Palsy*) se describen las manifestaciones encontradas en seis pacientes; básicamente: temblor involuntario junto con una disminución en la fuerza muscular, además de una propensión a doblar el tronco hacia delante y una incapacidad de ejecutar movimientos [66]. Fue hasta la década de 1950, después de que Arvid Carlsson demostrara que la DA actúa como un neurotransmisor en el cerebro, que el papel de la DA en la EP empezó a dilucidarse [14]. A finales de dicha década, Oleh Hornykiewicz observó que en la EP disminuyen drásticamente los niveles de DA en los núcleos caudado y putamen. Esto lo llevó a sugerir el uso de la L-DOPA para restituir los niveles de DA en el cerebro y así contrarrestar las manifestaciones clínicas de los pacientes [67].

Actualmente la EP que se clasifica como una enfermedad neurodegenerativa y progresiva asociada con el envejecimiento, aunque hay variedades de la enfermedad que aparecen en edades tempranas. Las características anatomopatológicas más distintivas de la EP incluyen la muerte progresiva de las neuronas de la SNc y la acumulación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína (cuerpos de Lewy) en la medula espinal, el tallo y la corteza cerebral. Similar a lo descrito por James Parkinson, las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se han relacionado con la disfunción motora: acinesia, bradicinesia, temblor en reposo, rigidez y problemas posturales. Con el tiempo, los pacientes presentan, además, afecciones cognitivas y psiquiátricas que se correlacionan con la cantidad de cuerpos de Lewy [66,68].

## 4.6.2. Etiología

### 4.6.2.1. Factor genético

A la fecha no se ha establecido claramente la etiología de la EP. De manera similar a lo que ocurre con muchas enfermedades, parece ser que en el desarrollo de la EP participan factores genéticos y ambientales [66]. En relación con los primeros, se han identificado más de una decena de *loci* asociados con la EP (PARKs), así como también mutaciones que causan formas familiares (monogénicas) de esta enfermedad o que están relacionados con la misma (Tabla 4) [68]. Mutaciones en los genes de la cinasa LRRK-2 (*leucin rich repeat kinase 2*), PINK (*PTEN induced putative kinase 1*) y de la proteína DJ-1 se han asociado con formas familiares de la EP (PARK 6, 7 y 8, respectivamente). PINK fosforila proteínas mitocondriales en respuesta a condiciones de estrés celular y se ha sugerido que esto previene una disfunción de la mitocondria; mientras que se ha encontrado que DJ-1 puede actuar como antioxidante proteico o como un sensor de estrés oxidativo [68]. Sin embargo, las formas familiares de la EP son raras.

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína cuya conformación nativa carece de una estructura predominante que haya sido determinada, pero que dependiendo del microambiente puede formar especies oligoméricas. Aunque su función no se ha establecido claramente, su localización preferente en terminales pre-sinápticas y las observaciones realizadas en el ratón deficiente de esta proteína sugieren que participa en la liberación de neurotransmisores, específicamente en el paso de reciclaje de las vesículas sinápticas [68]. La relación entre las variantes génicas de la  $\alpha$ -sinucleína (PARK 1 & 4) y la EP es consistente con los hallazgos histopatológicos que muestran que la forma fibrilar de esta proteína es el principal componente de los cuerpos de Lewy. Las mutaciones de la  $\alpha$ -sinucleína asociadas con la EP ocasionan un aumento en su expresión o un cambio en su estructura, lo que podría favorecer

su agregación y la formación de formas oligoméricas similares a las encontradas en los cuerpos de Lewy [66,68].

En el locus PARK 2 se identificó al gen de la parkina, una proteína con actividad de ligasa (E3) de ubiquitina que forma parte del sistema de degradación de proteínas relacionado con el proteosoma (sistema ubiquitina-proteosoma). Las mutaciones en el gen de la parkina disminuyen su actividad o su expresión por lo que podrían resultar en una acumulación excesiva de proteínas, como la sinfilina-1 y la sinaptotagmina XI, que son sustratos de esta E3 ligasa. De manera alternativa, el papel neuroprotector de la parkina se ha relacionado con su capacidad de reducir el estrés oxidativo, aunque los mecanismos aún no se han dilucidado [68].

Tabla 4. *Loci y genes asociados con la EP<sup>1</sup>*

Locus	Región cromosomal	Gene
PARK 1 & 4	4q21-q23	<i>α-sinucleína</i>
PARK 2	6q25.2-q27	<i>Parkina</i>
PARK 3	2p13	<i>desconocido</i>
PARK 5	4p14	<i>UCH-L1</i>
PARK 6	1p35-p36	<i>PINK1</i>
PARK 7	1p36	<i>DJ-1</i>
PARK 8	12p11.2-q13.1	<i>LRRK2</i>
PARK 10	1p32	<i>desconocido</i>
PARK 11	2q22-q23	<i>desconocido</i>
NA	5q23.1-q23.3	<i>Sinfilina-1</i>
NA	2q22-q23	<i>NR4A2/Nurr1</i>

<sup>1</sup>Modificada de la ref. [68]. NA, no asignado

#### 4.6.2.2. Factores ambientales

Aunque el principal factor de riesgo asociado con la EP es la edad [66], se han identificado factores ambientales que inducen la aparición de algunos síntomas o que llevan a

las características fisiopatológicas de esta enfermedad. Por ejemplo, compuestos presentes en herbicidas como el *paracuat*, el fungicida *maneb* y el insecticida *rotenona* inducen la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal en roedores [69]. Tanto el *paracuat* como la *rotenona* inhiben el complejo I mitocondrial e inducen la formación de estructuras similares a los cuerpos de Lewy. La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un compuesto contaminante de las drogas sintéticas que produce, en poco tiempo, los signos de la EP: temblor, acinesia, rigidez, postura en flexión, alteración de reflejos posturales y tendencia al mutismo; mismos que pueden tratarse mediante la administración de L-DOPA o agonistas dopaminérgicos. La necropsia de individuos que desarrollaron el síndrome parkinsoniano tras exponerse al MPTP muestra daño en la SNc. Estudios en animales han demostrado que el MPTP es un inhibidor del complejo I mitocondrial [68].

Es necesario resaltar que tanto los factores genéticos como los ambientales relacionados con la EP llevan a un mismo fin: la degeneración de la vía nigroestriatal. Lo anterior confirma que el déficit de DA juega un papel central en el desarrollo de la sintomatología de la EP y, al mismo tiempo, contribuye a tener puntos de partida en el estudio de los mecanismos patogénicos que llevan a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas.

#### 4.6.2.3. *Mecanismos involucrados en la patogénesis*

Tanto en la EP familiar como en la forma esporádica (idiopática), los mecanismos involucrados en la patogénesis están relacionados con alguno(s) de los siguientes fenómenos: deficiencias en el funcionamiento de la mitocondria, estrés oxidativo y/o nitrosativo, acumulación excesiva de proteínas con plegamiento incorrecto, y disfunción del sistema de degradación de proteínas relacionado con la ubiquitina y el proteosoma (sistema ubiquitina-proteosoma). De manera interesante, todos estos fenómenos están interrelacionados y presentan algún vínculo con los genes asociados con la EP. Por ejemplo, se ha propuesto que las formas fibrilares de la  $\alpha$ -sinucleína afectan directamente la capacidad proteolítica del sistema ubiquitina-proteosoma. Además, en líneas celulares, se ha observado que la

sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína, en particular de las formas mutantes, ocasiona deficiencias en la función mitocondrial. El estrés oxidativo resultado de un mal funcionamiento de la mitocondria o debido a un aumento en el metabolismo de DA altera el sistema ubiquitina-proteosoma, lo que a su vez genera estrés oxidativo y nitrosativo creando así un círculo vicioso. La formación de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína por la inhibición del complejo I mitocondrial, tanto *in vitro* como *in vivo*, apoyan este argumento. La acumulación de radicales libres, proteínas S-nitrosiladas y mal plegadas son el cuadro fisiopatológico que lleva a la muerte neuronal y a la neurodegeneración. Se ha observado que las neuronas dopaminérgicas son particularmente vulnerables a los procesos descritos [68].

#### 4.6.3. Tratamiento

La EP es una enfermedad incurable. Los tratamientos son paliativos y mejoran la calidad de vida de los pacientes por algún tiempo, posteriormente aparecen las discinesias tardías que empeoran de manera acelerada el estado físico del paciente [66]. Desde finales de la década de 1950 fue claro que la concentración de DA en el estriado disminuye en la EP y por lo tanto, las estrategias terapéuticas para esta enfermedad han buscado restituir los niveles de este neuromodulador. La alternativa más comúnmente usada es la administración del precursor de la DA, la L-DOPA [70]: 300/600 mg/día en combinación con un inhibidor periférico de la DOPA descarboxilasa [66]. Este tratamiento sigue siendo vigente, a pesar de que su eficiencia está limitada a un periodo relativamente corto (5-7 años) y que además trae consigo efectos secundarios motores y conductuales: discinesias tardías (movimientos anormales involuntarios: tics, temblores, contracciones) [70], desordenes impulsivos (ej. apuestas y compras compulsivas, hipersexualidad) y conductas anormales repetitivas sin un objetivo aparente [66]. En la búsqueda de un mejor tratamiento farmacológico se combina la L-DOPA con inhibidores de la monoamino oxidasa B, con antagonistas para los  $D_2R_{\text{clase}}$ , como el haloperidol, o con antagonistas colinérgicos [66]; esto último debido a que se ha observado que el déficit de DA induce un aumento en la concentración de acetilcolina

(hipercolinergia) en el estriado [71]. Recientemente se han empezado a utilizar monoterapias basadas en agonistas dopaminérgicos [66].

Como una alternativa se ha buscado restituir los niveles de DA mediante el trasplante intracerebral de células productoras de DA. Este enfoque parece tener más ventajas que la terapia farmacológica con L-DOPA, ya que intenta restituir la DA mediante su síntesis y liberación *in situ* y, al mismo tiempo, restablecer las sinapsis del circuito. Sin embargo, esto aún no se ha conseguido: si bien se ha observado que las células trasplantadas sobreviven por más de 10 años [72,73], se han encontrado indicios de neurodegeneración en las mismas (cuerpos de Lewy) [73]. Además, se ha sugerido que las células trasplantadas son incapaces de establecer sinapsis, de forma tal que sólo se restablecen niveles tónicos de secreción de DA y no los niveles dinámicos de secreción, que cambian de acuerdo con la demanda [74]. Por otro lado, mediante la estimulación profunda del cerebro (*Deep brain stimulation*, DBS), en regiones como el subtálamo, se han observado beneficios terapéuticos en pacientes con EP [75].

#### 4.6.4. Modelos animales de la EP

Para reproducir en animales de laboratorio los cambios patológicos observados en los pacientes con EP se han empleado métodos farmacológicos, de biología molecular y animales transgénicos (Tg). Con base en las evidencias que sugieren la participación de la  $\alpha$ -sinucleína y la parkina en la EP, se han desarrollado modelos Tg en los cuales se manipula la expresión de estas proteínas. Sin embargo, el aumento en la expresión de  $\alpha$ -sinucleína en el ratón Tg [76] o bien inducida mediante vectores virales inyectados en la SNc [77,78] no provoca anormalidades conductuales significativas. En estos modelos la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y los niveles de DA en el estriado disminuyen aproximadamente en un 50% [77]. En el ratón deficiente de parkina no se observan problemas motores ni cambios en los niveles de DA [79]. A diferencia de estos modelos Tg,

en el ratón con el gene de la tirosina hidroxilasa (TH) inactivado específicamente en las neuronas dopaminérgicas se observan alteraciones severas en la actividad motora y la ingesta de alimentos desde las primeras semanas después del nacimiento [80,81]. Más aún, actuando a través del los  $D_1R_{clase}$ , la administración crónica de L-DOPA genera conductas motoras repetitivas *estereotipadas* (olfateo, aseo vigoroso, movimiento continuo de las patas delanteras hacia la boca) [82].

En lo que respecta a los modelos farmacológicos, la inhibición de la síntesis de DA se puede conseguir de manera aguda mediante la administración sistémica de  $\alpha$ -metil-*p*-tirosina ( $\alpha$ MPT). Este modelo se ha usado para evaluar la eficacia de algunos fármacos, como la Ciladopa o el Pramipexole (agonistas dopaminérgicos), en el tratamiento de la EP. Por otro lado, para inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se ha empleado rotenona y MPTP. Con la rotenona se observa la formación de cuerpos de Lewy, una reducción en la movilidad y alteraciones en la postura. Sin embargo, no se ha comprobado que dichos efectos sean revertidos con la administración de L-DOPA ni que la neurodegeneración se presente únicamente en la vía nigroestriatal. En el caso del MPTP, su capacidad neurotóxica ha sido demostrada en diversas especies animales incluyendo macacos, ratones y gatos. Sin embargo, los estudios realizados en primates han demostrado que la lesión inducida por MPTP no afecta de forma exclusiva a las neuronas dopaminérgicas de la SNc: en otras áreas cerebrales como el núcleo *accumbens*, hipocampo, amígdala y la corteza cerebral la reducción en el contenido de DA es similar a la descrita en el estriado [83].

Originalmente descrito en ratas por Ungerstedt & Arbuthnott en 1970 [84], el modelo animal de la EP más empleado a la fecha consiste en inducir la degeneración de la vía nigroestriatal mediante la administración local de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en uno de los hemisferios cerebrales, ya sea directamente en la sustancia negra compacta o en el haz de fibras dopaminérgicas del cerebro medio [85,86]. En ambos casos, la

6-OHDA ocasiona un déficit de DA de más del 95% en el estriado del hemisferio lesionado [87]. Debido a que la lesión se realiza de manera unilateral, estos animales se conocen como hemiparkinsonianos y en muchos casos el hemisferio intacto (no lesionado) se utiliza como control durante la experimentación. Después de dos semanas de la lesión el nivel de DA en el estriado y la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas del hemisferio afectado se han reducido significativamente, las incapacidades motoras se hacen evidentes y se observan claramente cambios morfológicos, bioquímicos y conductuales [85,88]. Por ejemplo, se ha observado una disminución en la densidad de las espinas en las dendritas de las NEMs [89]. A nivel bioquímico se observa un aumento en la activación de la cinasa CAMKII [90] y un incremento en la sensibilidad de los receptores de DA presentes en las NEMs del hemisferio deficiente de DA (supersensibilidad, ver abajo), así como alteraciones en la expresión de los neuropéptidos encefalina y sustancia P [85]. A nivel conductual, diferentes paradigmas experimentales como la prueba de *ajuste de pasos*, la prueba de *escalera* y el laberinto de agua de Morris han mostrado que en el modelo de ratas hemiparkinsonianas se presentan problemas motores y cognitivos que se asemejan a las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes con EP [85].

## 4.7. Supersensibilidad de los receptores de DA

La supersensibilidad de los receptores de DA que sigue a la pérdida de neuronas dopaminérgicas, tanto en pacientes con EP como en modelos de esta enfermedad, es un fenómeno ampliamente reportado. De manera similar a lo que ocurre en otros sistemas receptor-ligando [91,92], la supersensibilidad de los receptores de DA podría ser parte de una adaptación fisiológica orientada a compensar el déficit de ligando.

En ratas hemiparkinsonianas se ha observado un incremento en la señales moleculares activadas por los  $D_1R_{\text{clase}}$  [93,94]; sin embargo, el aumento en su expresión es controversial [9,95-98]. Por el contrario, el aumento en la expresión de los  $D_2R_{\text{clase}}$  ha sido demostrado por diferentes grupos de investigación [88,93,95,97-100]. Este aumento se ha correlacionado con la conducta de giro que presentan las ratas hemiparkinsonianas en respuesta a la administración de agonistas dopaminérgicos; se ha propuesto que la conducta rotatoria se debe al desequilibrio que ocurre por la supersensibilidad a la DA en uno de los hemisferios cerebrales. El animal va a rotar predominantemente hacia el lado contralateral al estriado con actividad dopaminérgica dominante [87,101]. A nivel molecular, la supersensibilidad de los  $D_2R_{\text{clase}}$  se ha correlacionado con un incremento en la interacción entre estos receptores y las proteínas G correspondientes. Se ha observado también un aumento en la activación de las proteínas G [93,102] y en las vías de señalización que involucran a la PLD [103] y a la cinasa ERK [104,105].

## 5. Justificación

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Su prevalencia en la población mayor a 65 años es de aproximadamente 2% e incrementa significativamente con la edad [106]. Dado este escenario y tomando como base las cifras del INEGI [107], se calcula que podrían existir alrededor de 200,000 individuos con esta afección en México. Por si esto fuera poco, se prevé un incremento en la prevalencia de esta enfermedad como consecuencia del envejecimiento de la población [66]. Considerando lo anterior, el estudio de los cambios a nivel fisiológico que ocurren en las neuronas estriatales que se ven afectadas por el déficit de DA adquiere una relevancia significativa.

## 6. Planteamiento del problema

Evidencias conductuales y bioquímicas muestran que al disminuir los niveles de DA ocurre una supersensibilización de los  $D_2R_{clase}$  en el estriado; sin embargo, no existen correlatos electrofisiológicos a nivel celular de este fenómeno, el cual está estrechamente relacionado con la EP. En otras palabras, se desconoce el significado que la supersensibilidad de los  $D_2R_{clase}$  tiene en la fisiología de las NEMs. Considerando que la corriente de  $Ca^{2+}$ , vital para la actividad neuronal, es modulada por la DA, en este trabajo se estudió el papel de los  $D_2R_{clase}$  en dicha modulación en NEMs disociadas de ratas control y hemiparkinsonianas. Las preguntas que guiaron la investigación fueron las siguientes:

- a) ¿Qué magnitud tiene la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  mediada por los  $D_2R_{clase}$  en NEMs privadas de la inervación dopaminérgica y cómo se compara con la observada en NEMs obtenidas de un estriado control?
- b) ¿Qué tipo(s) de receptor(es) de la familia  $D_2R_{clase}$  muestran una actividad supersensibilizada?
- c) ¿Cuál es la vía de señalización involucrada en la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  dependiente del  $D_3R$ ?
- d) ¿Qué tipo de canales son modulados por el  $D_3R$ ?
- e) ¿Ocurren cambios en la expresión del  $D_3R$  en el estriado después de la lesión por 6-OHDA?

## 7. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis general

Considerando que la falta de DA en el Nst lleva a la supersensibilización de los  $D_2R_{clase}$ , proponemos que la modulación de la corriente  $Ca^{2+}$  mediada por la activación de estos receptores es mayor en NEMs del hemisferio con déficit de DA (lesionado), en comparación con las provenientes del hemisferio intacto (control) o de ratas sin ningún tratamiento (*naive*).

### Objetivo general

Estudiar la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  por la activación de los  $D_2R_{clase}$  en NEMs disociadas de cerebros de roedores privados de la innervación dopaminérgica mediante la lesión unilateral de la SNc con 6-OHDA.

### Objetivos específicos:

Todos los objetivos incluyen la comparación entre neuronas obtenidas del estriado control con el privado de DA (hemisferio lesionado con 6-OHDA) de ratas hemiparkinsonianas. En algunos experimentos se usaron también neuronas estriatales obtenidas de ratas *naive*.

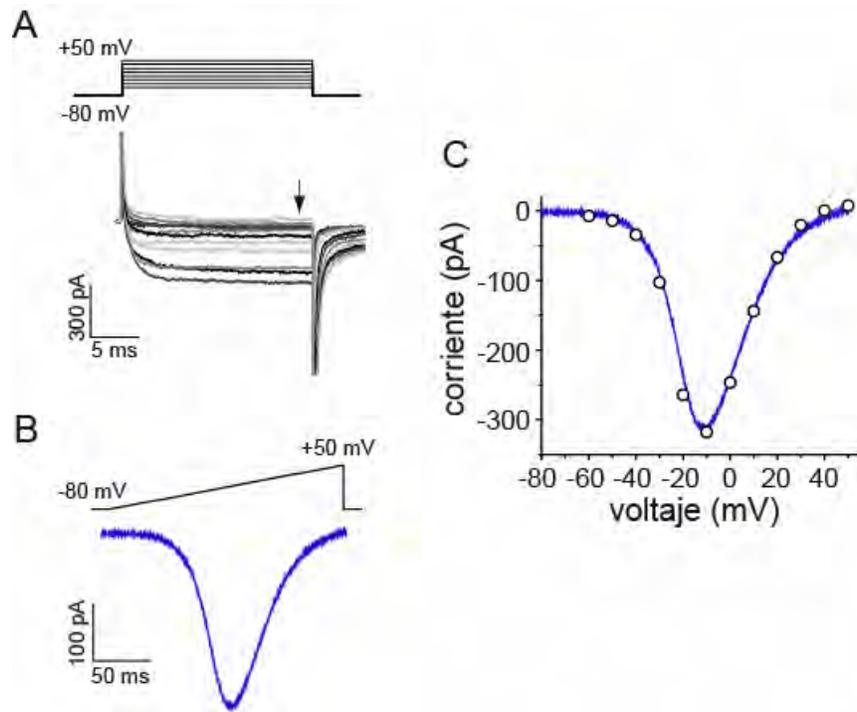
1. Caracterizar la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en NEMs mediante registros electrofisiológicos de fijación de voltaje en la configuración de célula entera.
2. Cuantificar la expresión de los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en tejido estriatal por inmunodetección tipo “*Western*”.
3. Evaluar el efecto de agonistas para los  $\text{D}_2\text{R}_{\text{clase}}$  sobre la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en NEMs.
4. Disecar farmacológicamente la contribución de los receptores  $\text{D}_2$ ,  $\text{D}_3$  y  $\text{D}_4$  en la modulación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ .
5. Estudiar las vías de señalización involucradas en la modulación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el  $\text{D}_3\text{R}$ .
6. Determinar electrofisiológicamente el tipo de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que es modulada por la activación del  $\text{D}_3\text{R}$ .
7. Por inmunodetección tipo “*Western*”, cuantificar la expresión del  $\text{D}_3\text{R}$  y de su variante alternativa  $\text{D}_3\text{nf}$  en tejido estriatal.

## 8. Resultados

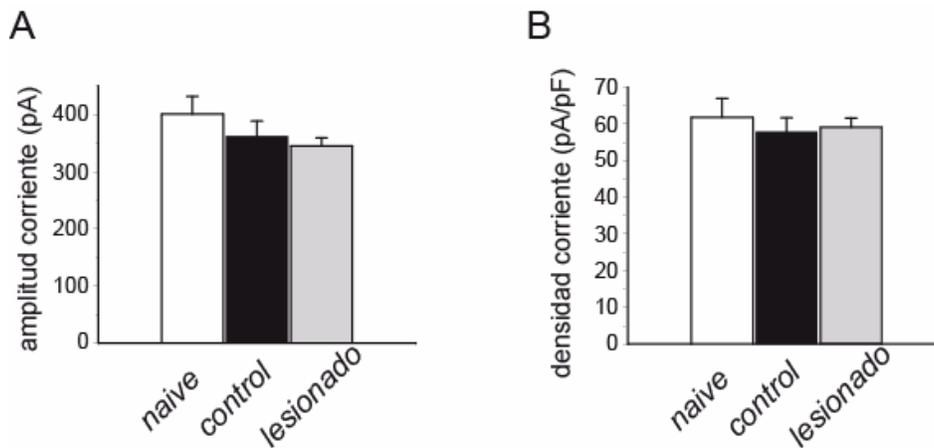
### Corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ expresadas en las NEMs

La corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  se registró en neuronas estriatales obtenidas de animales no lesionados (*naive*), y de hemisferios contralaterales (lado control) e ipsilaterales (lado con déficit de DA) de animales hemiparkinsonianos lesionados unilateralmente con 6-OHDA (Fig. 1). La figura 1A muestra una familia de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  provocadas por comandos de voltaje despolarizantes de -80 a +50 mV en incrementos de 10 mV. La figura 1B ilustra la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada después de un comando en forma de rampa que abarca el mismo rango de voltaje (180 ms; 0.7 mV/ms). Las curvas I-V que resultan de ambos protocolos pueden ser superpuestas (Fig. 1C: símbolos= comando de pasos; línea= comando de rampa), lo que sugiere que la fijación espacial del voltaje es adecuada. Resultados similares se obtuvieron en neuronas obtenidas de ratas *naive* y hemiparkinsonianas (lados control y lesionado). Para mayor claridad, en las siguientes figuras se muestran únicamente las curvas I-V obtenidas con el protocolo de rampa.

El análisis global de los registros mostró que la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  fue similar al comparar neuronas de hemisferios *naive*, control y lesionado:  $400 \pm 31$  pA ( $n=46$ ),  $362 \pm 27$  pA ( $n=48$ ) y  $345 \pm 14$  pA ( $n=164$ ), respectivamente (Fig. 2A; NS). Tampoco se observaron diferencias al comparar la densidad de corriente (corriente/capacitancia celular) obtenida en cada condición experimental (Fig. 2B; NS), lo cual indica que el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no se afecta por la desnervación dopaminérgica.

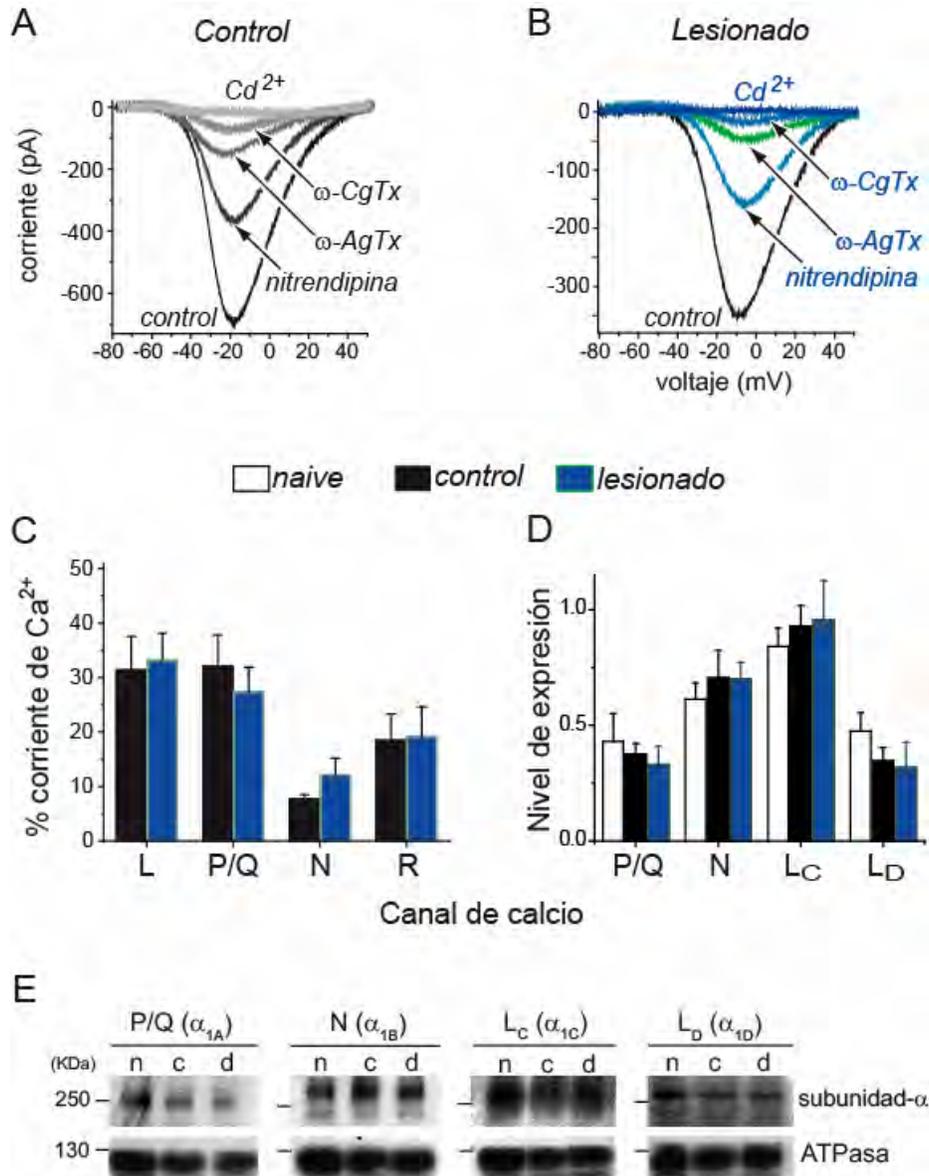


**Figura 1.** Corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en NEMs. **A.** Experimento representativo en donde se aprecia la familia de corrientes provocadas por comandos de voltaje de  $-80$  a  $+50$  mV en pasos de  $10$  mV (duración=  $20$  ms). La flecha indica el tiempo al que se tomaron las mediciones. **B.** La misma neurona fue sometida a un comando de voltaje despolarizante en forma de rampa, de  $-80$  a  $+50$  mV ( $180$  ms;  $0.7$  mV/ms). **C.** La relación corriente-voltaje (curva I-V) construida con los datos obtenidos con ambos protocolos, de pasos (círculos) y de rampa (trazo), muestra que se obtienen resultados equivalentes.



**Figura 2.** Amplitud y densidad de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . **(A)** Los valores corresponden al pico de la amplitud de la corriente y **(B)** al cociente obtenido al dividir la amplitud de corriente de cada célula entre su capacitancia.

En las NEMs los iones  $\text{Ca}^{2+}$  fluyen a través de diferentes tipos de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ :  $\text{Ca}_v1.2,3\text{-L}_{\text{C,D}}$ ,  $\text{Ca}_v2.1\text{-3-N}$ , P/Q y R. [18,108,109] Por lo tanto, se evaluó si la desnervación dopaminérgica alteraba la magnitud de la corriente generada a través de los diferentes canales. Para esto las neuronas fueron expuestas de manera secuencial a diferentes antagonistas (bloqueadores) de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : 10  $\mu\text{M}$  de nitrendipina para bloquear canales tipo L ( $\text{Ca}_v1$ ), 400 nM de  $\omega$ -agatoxina-TK para bloquear canales tipo P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ), 1  $\mu\text{M}$  de  $\omega$ -conotoxina GVIA para bloquear canales tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ), y finalmente,  $\text{Cd}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  para bloquear los canales restantes (de tipo R o  $\text{Ca}_v2.3$ ) [108]. La misma secuencia de antagonistas se administró a neuronas estriatales obtenidas de cada uno de los hemisferios de ratas hemiparkinsonianas. En neuronas del lado control (Fig. 3A) la corriente bloqueada (%) con cada antagonista fue como sigue:  $31\pm6\%$ ,  $32\pm6\%$ ,  $8\pm1\%$  y  $18\pm5\%$ , tras la aplicación de nitrendipina,  $\omega$ -agatoxina-TK,  $\omega$ -conotoxina GVIA y  $\text{Cd}^{2+}$ , respectivamente (n=7); mientras que los datos correspondientes al lado lesionado (Fig. 3B) fueron:  $33\pm6\%$ ,  $27\pm5\%$ ,  $12\pm3\%$  y  $19\pm5\%$ , respectivamente (n=8). Concluimos que no se observan diferencias significativas al comparar los resultados de cada muestra (Fig. 3C). Adicionalmente, mediante inmunodetección tipo “Western” se confirmó que la desnervación dopaminérgica no altera la expresión de las canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo  $\text{L}_{\text{C,D}}$ , N y P/Q (Fig. 3D,E).



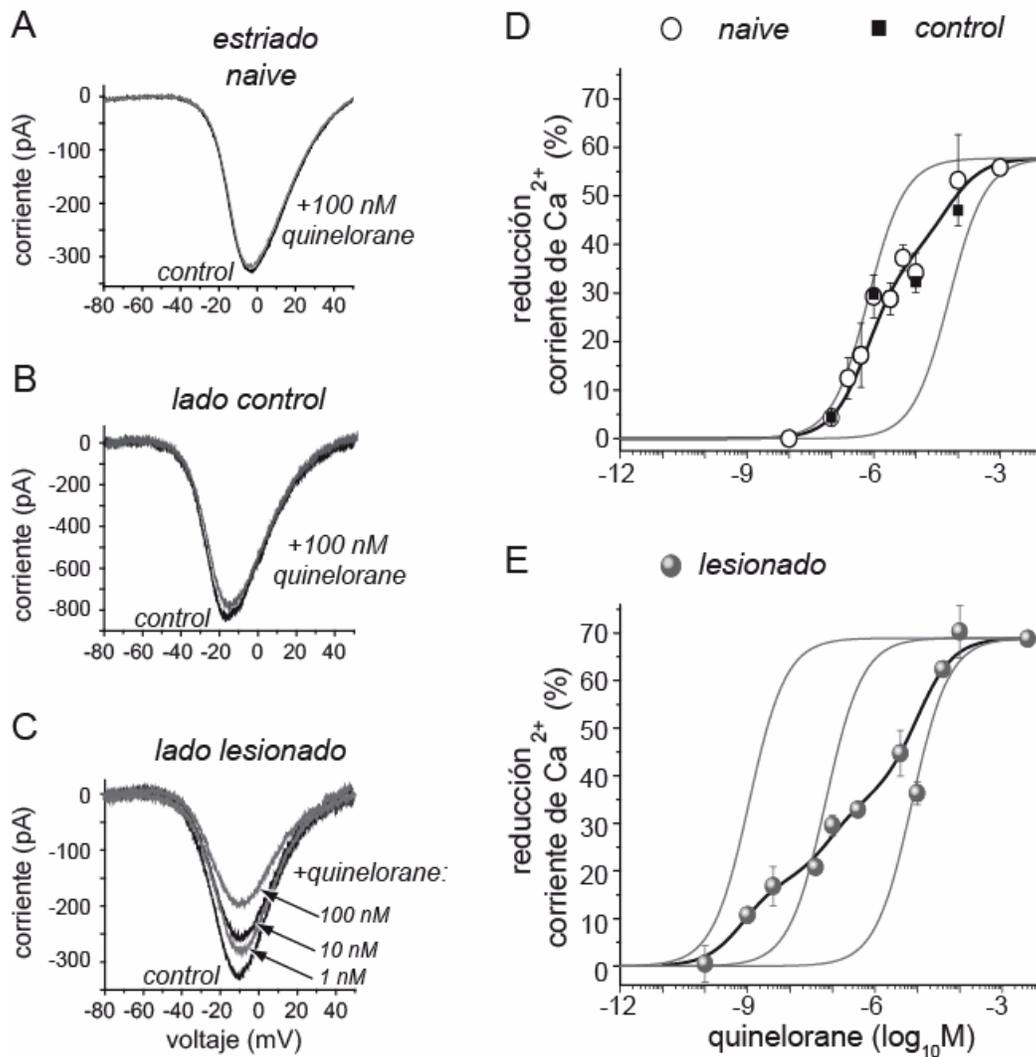
**Figura 3.** La expresión de los canales de  $Ca^{2+}$  en NEMs no es afectada por la desnervación dopaminérgica. **A,B.** Antagonistas selectivos para los diferentes tipos de canales de  $Ca^{2+}$  se administraron en orden secuencial (ver texto) a neuronas dissociadas del lado control (**A**; n=7) y del lado lesionado (**B**; n=8) de ratas hemiparkinsonianas. **C.** No se observan diferencias al comparar las dos muestras. **D,E.** Análisis de densitometría (**D**) de la inmunodetección tipo “Western” de extractos proteicos obtenidos del estriado dorsal de animales naive (n) y de los hemisferios control (c) y deficiente de DA (d) de ratas hemiparkinsonianas (**E**). La señal obtenida con un anticuerpo anti-ATPasa  $Na^+/K^+$  (subunidad  $\alpha$ , ~110 kDa) fue usada para conocer la cantidad relativa de proteína en cada carril. Este valor se usó para normalizar la expresión observada para cada canal: nivel de expresión= señal correspondiente al canal/señal de ATPasa. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes; en cada uno se mezclaron las muestras obtenidas de al menos tres ratas.

## Correlato electrofisiológico de la supersensibilidad $D_2R_{\text{clase}}$

Con el objetivo de evaluar la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  mediada por los  $D_2R_{\text{clase}}$  se usó quinolorane, un agonista selectivo para esta clase de receptores [35,36,110]. De acuerdo con lo esperado, no todas las neuronas fueron responsivas al quinolorane: en el 70% de los casos se observó una inhibición de la corriente de  $Ca^{2+}$ . La aplicación de quinolorane 100 nM, una concentración que no produce efecto en ninguna neurona obtenida de estriados naive o control (Fig. 4A,B), claramente reduce la corriente de  $Ca^{2+}$  en neuronas disociadas del lado lesionado (Fig.4C). La figura 4D muestra la curva concentración-respuesta (C-R) obtenida con los datos de neuronas de estriados *naive* (círculos blancos; n=36) y control (cuadrados negros; n=14). El mejor ajuste para la curva C-R fue un modelo con dos sitios de acción (línea negra; coeficiente de Hill=  $0.57 \pm 0.12$ ), con  $IC_{50}$  de  $493 \pm 90$  nM y  $40 \pm 17$   $\mu$ M, respectivamente (líneas grises). El ajuste se realizó combinando los datos de estriados *naive* y control, ya que en una comparación previa entre estos no se observaron diferencias significativas.

En contraste, la relación C-R construida con los datos de las neuronas del lado deficiente en DA presentó: primero, un claro corrimiento hacia la izquierda que indica un aumento en la afinidad (Fig. 4E, círculos grises; n=32), segundo, un mejor ajuste con un modelo de tres sitios de acción (línea negra; coeficiente de Hill=  $0.32 \pm 0.04$ ), con tres valores de  $IC_{50}$ :  $0.8 \pm 0.1$  nM,  $90 \pm 17$  nM y  $9.8 \pm 1.5$   $\mu$ M (líneas grises;  $P < 0.0001$  y  $P < 0.001$  al comparar los dos sitios de menor afinidad con los correspondientes a la curva *naive*-control y  $P < 0.0001$  al comparar los coeficientes de Hill, prueba *t* de Student). Estos resultados muestran que la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  por los  $D_2R_{\text{clase}}$  se ve alterada después de la desnervación dopaminérgica y refleja un fenómeno de supersensibilidad por: 1) la aparición de un sitio de alta sensibilidad ( $IC_{50} = 0.8 \pm 0.1$  nM) correspondiente a 18% de la modulación; 2) la disminución en las  $IC_{50}$ , consistente con el aumento en la afinidad de estos receptores [111]; y 3) el incremento en la reducción máxima de la corriente de  $Ca^{2+}$  ( $E_{\text{max}}$ ):  $70 \pm 3\%$  (n=32 lado

lesionado) vs.  $57 \pm 4\%$  ( $n=50$  lado control/*naive*;  $P < 0.005$ ), que está de acuerdo con el aumento en el número de  $D_2R_{clase}$  [93,95,99,112].



**Figura 4.** Relación concentración-respuesta (curva C-R) para la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  por el agonista  $D_2R_{clase}$  quinolorane. **A-C.** Curvas I-V representativas antes (trazo negro) y durante (trazo gris) la aplicación de quinolorane en neuronas obtenidas de estriados *naive* (**A**), control (**B**) y lesionado (**C**). **D.** Curva C-R construida a partir de los datos obtenidos de neuronas de estriados de animales *naive* (círculos blancos) y del lado control (cuadrados negros) de ratas hemiparkinsonianas. El trazo negro es el ajuste correspondiente a dos sitios de acción, cada uno representado por las curvas grises;  $IC_{50}$ : 493 nM y 40  $\mu M$  ( $r^2=0.98$ ; ver métodos). **E.** La curva C-R correspondiente a las neuronas obtenidas del estriado con déficit de DA (círculos grises) se ajustó con un modelo de tres sitios, cada uno representado con las curvas grises:  $IC_{50}$ : 0.8 nM, 90 nM y 9.8  $\mu M$  ( $r^2=0.99$ ).  $P < 0.0001$  y  $P < 0.001$  al comparar los dos sitios de la curva de los estriados *naive*-control con los dos componentes a la derecha en la curva del estriado lesionado, respectivamente. El efecto máximo de reducción de la corriente ( $E_{max}$ ) obtenido con los estriados *naive*-control ( $57 \pm 4\%$ ;  $n=50$ ) fue significativamente menor comparado con el correspondiente al estriado deficiente de DA ( $70 \pm 3\%$ ;  $n=32$ ;  $P < 0.005$ ).

## Supersensibilidad del D<sub>3</sub>R

Sugere, la aparición de un tercer sitio de acción en la curva C-R correspondiente a las NEMs del lado lesionado nos llevó a diseñar estrategias farmacológicas para estudiar, en una misma célula, la participación de cada tipo de receptor perteneciente a la familia D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub>; el objetivo era dilucidar si el tercer sitio de acción correspondía a un tipo de receptor en particular [113].

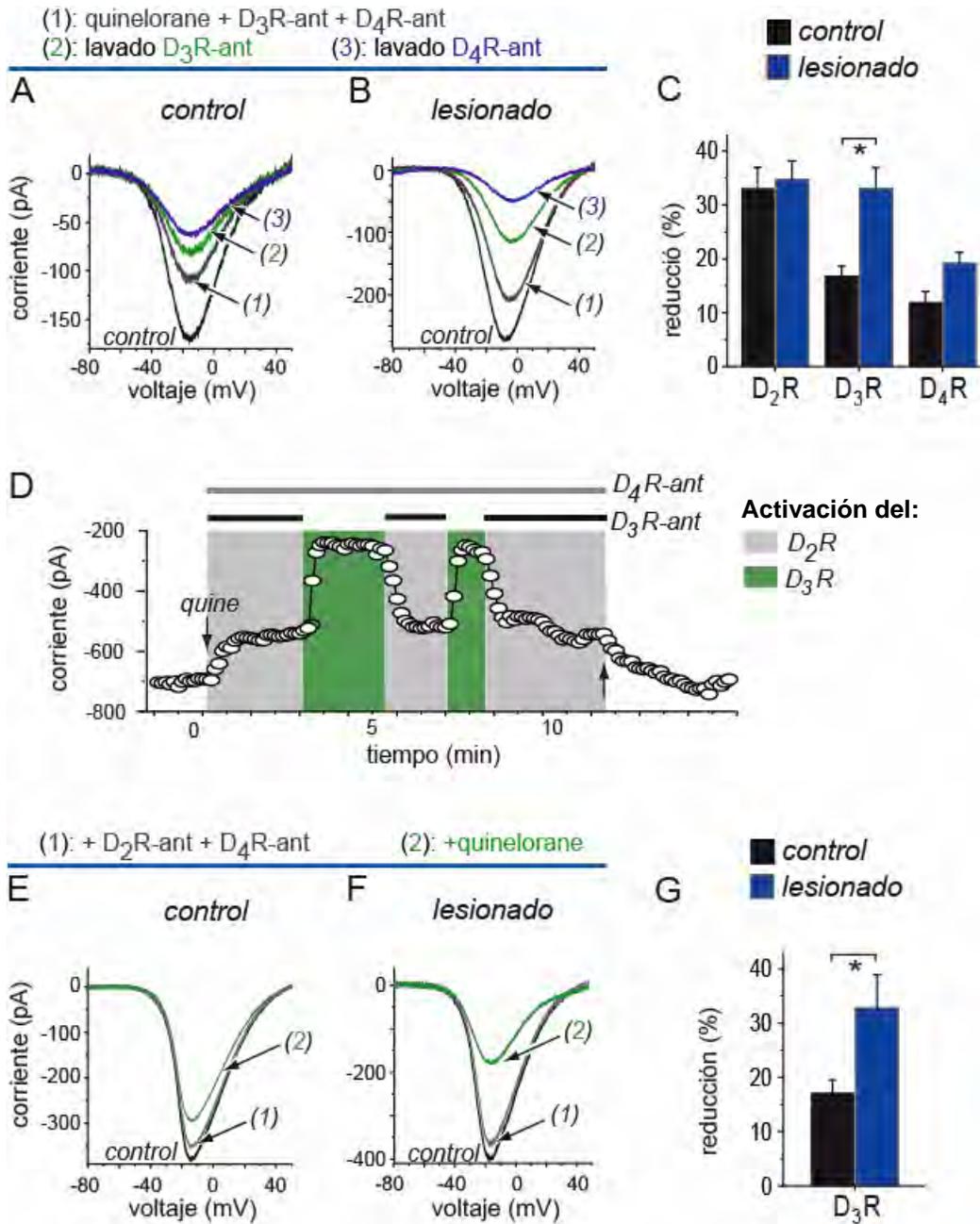
La primer estrategia consistió en administrar el agonista quinolorane a concentraciones saturantes (100 μM; ver efecto máximo en Fig. 3D), en presencia de antagonistas selectivos y en concentraciones también saturantes para los receptores D<sub>3</sub>, el U99194A (500 nM) [30], y D<sub>4</sub>, el L750,667 (50 nM) [32,33]. Con ambos antagonistas en el medio la acción del quinolorane revela, exclusivamente, la modulación dada por la activación de los receptores del tipo D<sub>2</sub>, pues los otros dos tipos de receptor están bloqueados. En estas condiciones y después de haber llegado a un estado de equilibrio, interrumpimos la administración del antagonista D<sub>3</sub>R (lavado del U99194A); en este paso la detección de algún cambio en la corriente se atribuyó a los receptores tipo D<sub>3</sub>, activados por el agonista quinolorane que se continúa aplicando a la misma concentración. Como último paso, el antagonista del D<sub>4</sub>R dejó de ser aplicado (lavado del L750,667) y la acción resultante, en caso de haberla, se atribuyó a la activación de este receptor. El orden en que se activaron los receptores no influyó en la respuesta observada. Con este diseño experimental, los resultados mostraron que la única actividad que incrementaba en las neuronas disociadas del lado lesionado, es la del D<sub>3</sub>R (P < 0.05 en comparación con las neuronas de lado control; Fig. 5A-C). No se observaron cambios en la magnitud de la modulación mediada por los receptores de los tipos D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub>, a pesar del ya descrito corrimiento de las IC<sub>50</sub> hacia la izquierda. El curso temporal de un experimento representativo se muestra en la Fig. 5D; puede observarse que el efecto del D<sub>3</sub>R es reversible e independiente de la acción del D<sub>2</sub>R: al inicio el quinolorane activó al D<sub>2</sub>R sin que se observara, en la ventana de tiempo estudiada, un proceso de desensibilización

(flechas de entrada y salida); mientras que la acción sobre el D<sub>3</sub>R pudo ser evocada repetidamente después de lavar el antagonista U99194A (n=10) dos veces consecutivas.

Las Figs. 5E y F muestran un protocolo de activación alternativo: primero, las neuronas fueron expuestas a concentraciones saturantes (50 nM) de los antagonistas selectivos para los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub> (L741,626 y L750,667, respectivamente) [32,33]; después, fue administrado el agonista quinolorane a concentración saturante (100 μM). De esta manera, el único receptor con capacidad de activarse es el D<sub>3</sub>R. Este protocolo confirmó que la acción del D<sub>3</sub>R sobre la corriente de Ca<sup>2+</sup> está incrementada significativamente en las neuronas del estriado con déficit de DA (P < 0.05; Fig. 5G).

Los histogramas de las Figs. 5C,G resumen los resultados de esta serie de experimentos: con el primer protocolo, la magnitud de la disminución de la corriente de Ca<sup>2+</sup> asociada con cada tipo de receptor de la familia D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> fue como sigue (Fig. 5C): D<sub>2</sub>R, 33±4% (lado control, n=8) y 35±3% (lado lesionado, n=11; no significativo, NS); D<sub>3</sub>R, 17±2% (lado control, n=7) y 33±4% (lado lesionado, n=10; P<0.05); D<sub>4</sub>R, 13±2% (lado control n=8) y 19±2% (lado lesionado, n=7; NS). Estos porcentajes incluyen a todas las neuronas responsivas al quinolorane. Hacemos notar que no en todos los casos se observan efectos al lavar un antagonista (ver Fig. 6). Asimismo, resaltamos que la suma de los efectos (%) asociados con cada tipo de receptor es mayor en el caso de las NEMs del lado lesionado (35% + 33% + 19% = **87%**), en comparación con las neuronas del lado control (33% + 17% + 13% = **63%**; P < 0.05). Lo anterior es consistente con nuestro hallazgo anterior: la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> se ve alterada después de la desnervación dopaminérgica y refleja un fenómeno de supersensibilidad. Con el segundo protocolo de activación (Fig. 5G) se confirmó el incremento en la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> mediada por los D<sub>3</sub>R: de 17±2% en neuronas del lado control a 33±6% en neuronas del lado lesionado (n=14; P<0.05). Ambos protocolos, utilizando fármacos diferentes, coinciden.

En resumen: la aplicación de diferentes combinaciones de antagonistas a una población heterogénea de neuronas estriatales arrojó un mismo resultado: la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  mediada por la activación de los  $D_3R$  se incrementa aproximadamente al doble después de la lesión de la vía nigroestriatal.



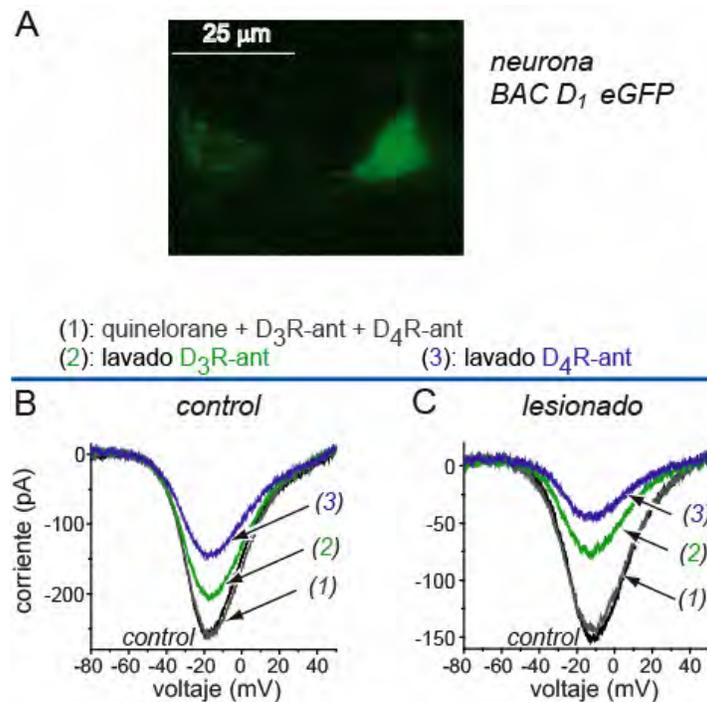
**Figura 5.** La acción  $D_3R$  se incrementa en neuronas del estriado con déficit de DA. **A,B.** Neuronas disociadas de los lados control (**A**) y lesionado (**B**) de una rata

hemiparkinsoniana fueron expuestas a quinolorane (100  $\mu$ M; concentración saturante; Fig. 4) en presencia de antagonistas selectivos para el D<sub>3</sub>R (“D<sub>3</sub>R-ant”), U99194A 500 nM; y para el D<sub>4</sub>R (“D<sub>4</sub>R-ant”), L750,667 50 nM (concentraciones saturantes). En estas condiciones puede observarse una respuesta relacionada con la activación del D<sub>2</sub>R (1). Al dejar de administrar el antagonista U99194A (lavado D<sub>3</sub>R-ant) se observa el efecto asociado con el D<sub>3</sub>R (2); mientras que al lavar el antagonista L750,667 (lavado D<sub>4</sub>R-ant) se observa el efecto debido a la activación de los D<sub>4</sub>R (3). El efecto asociado a cada tipo de receptor no se observó en todas las neuronas (ver Fig. 6). **C.** Histograma de los resultados obtenidos en los experimentos descritos en (A) y (B), donde puede observarse que únicamente la respuesta asociada con el D<sub>3</sub>R fue significativamente mayor en las neuronas del lado lesionado (\*P < 0.05). **D.** Curso temporal de un experimento representativo de (A) y (B): el quinolorane moduló de manera reversible e independiente la corriente de Ca<sup>2+</sup> al activar al D<sub>3</sub>R. La acción D<sub>2</sub>R también fue reversible y no presentó desensibilización. Las líneas en la parte de arriba indican la presencia de los antagonistas para D<sub>3</sub>R y D<sub>4</sub>R. Las flechas señalan el inicio y el término de la aplicación de quinolorane. **E,F.** El quinolorane (100  $\mu$ M) fue aplicado después de que las células fueron expuestas (15 min) a los antagonistas selectivos para los receptores D<sub>2</sub>R (“D<sub>2</sub>R-ant”), L741,626 50 nM; y D<sub>4</sub>R (“D<sub>4</sub>R-ant”), 50 nM. **G.** Histograma que resume los resultados de los experimentos descritos en (E) y (F), y que permite diseccionar la disminución de la corriente de Ca<sup>2+</sup> debida a la activación del D<sub>3</sub>R (\*P < 0.05).

La acción D<sub>3</sub>R fue observada en el 64% y 59% de las neuronas disociadas de los lados control (7/11) y lesionado (10/17), respectivamente. Se hace notar que la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R se presentó también en neuronas que no respondieron a la activación del D<sub>2</sub>R (neuronas sin “efecto D<sub>2</sub>R”; dato no mostrado), sugiriendo que la respuesta D<sub>3</sub>R se detecta también en neuronas de la vía directa. Para confirmar la firmeza de este dato, el protocolo de lavado secuencial de los antagonistas fue empleado en neuronas del ratón transgénico BAC (*bacterial artificial chromosome*) D<sub>1</sub>-eGFP, en el cual la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) se encuentra bajo el control del promotor del D<sub>1</sub>R [114]. De esta manera, en el ratón BAC D<sub>1</sub>-eGFP es posible identificar y registrar selectivamente a las neuronas de la vía directa (Fig. 6A), que expresan principalmente D<sub>1</sub>R, y en muy baja frecuencia (10%) receptores del tipo D<sub>2</sub> [9].

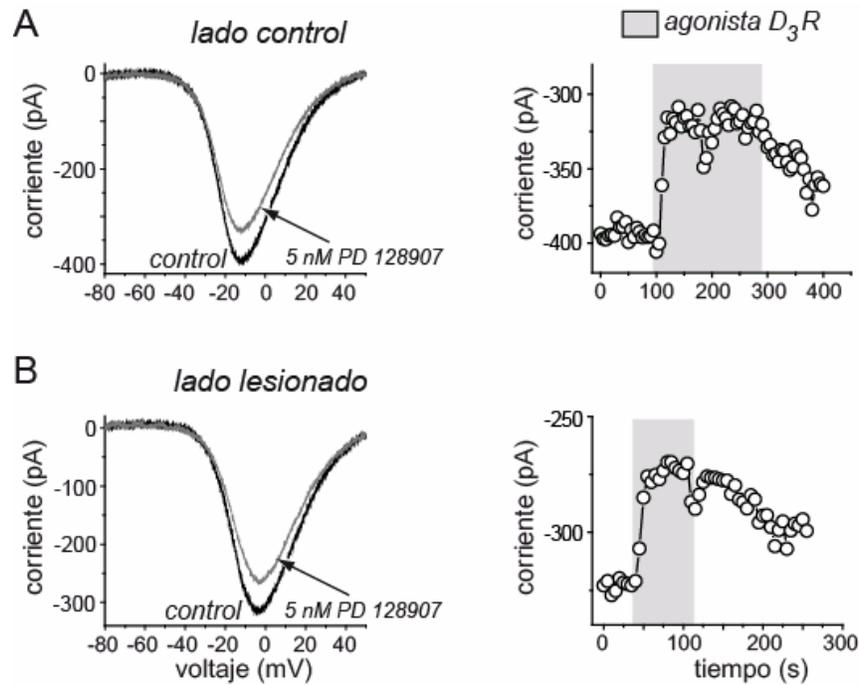
La figura 6B muestra un ejemplo representativo de la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> en una neurona que expresa la eGFP (D<sub>1</sub>-eGFP<sup>+</sup>), obtenida del ratón BAC D<sub>1</sub>-eGFP. De acuerdo con lo esperado, estas neuronas no presentaron modulación de la corriente al activar

al D<sub>2</sub>R (neuronas sin “efecto D<sub>2</sub>R”). Sin embargo, en algunas de ellas se observaron acciones de los receptores D<sub>3</sub>R y/o D<sub>4</sub>R [113]. Aún preliminares, los resultados muestran que en neuronas disociadas del estriado del ratón BAC D<sub>1</sub>-eGFP deficiente en DA la modulación dependiente de los D<sub>3</sub>R es mayor comparada con la observada en las neuronas D<sub>1</sub>-eGFP<sup>+</sup> del lado control (47.2% y 21.9%, respectivamente; n=4/15; Figs. 6B, C). Esto sugiere que la acción del D<sub>3</sub>R sobre la corriente de calcio incrementa en ausencia de DA, tanto en neuronas de la vía directa como de la vía indirecta.



**Figura 6.** La acción D<sub>3</sub>R es mayor en las neuronas D<sub>1</sub>-eGFP<sup>+</sup> disociadas del estriado deficiente de DA. **A.** Neurona estriatal D<sub>1</sub>-eGFP<sup>+</sup> aislada de un ratón BAC D<sub>1</sub>-eGFP. **B,C.** Neuronas D<sub>1</sub>-eGFP<sup>+</sup> del estriado control (**B**) y lesionado (**C**) fueron expuestas a quinolorane (100 μM; concentración saturante, Fig. 3) en presencia de antagonistas selectivos para los receptores D<sub>3</sub>R (“D<sub>3</sub>R-ant”), U99194A 500 nM; y D<sub>4</sub>R (“D<sub>4</sub>R-ant”), L750,667 50 nM (concentraciones saturantes). Las neuronas no presentaron efecto asociado con la activación del D<sub>2</sub>R (1). El lavado del U99194A mostró el efecto putativo del D<sub>3</sub>R (2), mientras que el lavado del L750,667 mostró la acción del D<sub>4</sub>R (3). La respuesta asociada con el D<sub>3</sub>R fue observada en el 27% de las neuronas D<sub>1</sub>-eGFP<sup>+</sup> (4/15) y en el 33% de las neuronas de rata que no tuvieron modulación por el D<sub>2</sub>R (2/6; dato no ilustrado). El efecto del D<sub>3</sub>R fue mayor en neuronas provenientes del estriado con déficit de DA, comparadas con las correspondientes al lado control (47.2% y 21.9%, respectivamente).

La presencia del D<sub>3</sub>R en NEMs estriatales se confirmó mediante la estimulación con un agonista selectivo para este receptor: el PD128907 (5 nM) [29]. El agonista disminuyó la corriente de Ca<sup>2+</sup> aproximadamente en el 70% de las neuronas disociadas de los lados control y lesionado de una rata hemiparkinsoniana (Fig. 7A,B; n=25; P<0.05).



**Figura 7.** Modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por el agonista D<sub>3</sub>R selectivo PD128907. **A,B.** Concentraciones de 5 nM del PD128907 permiten observar modulación en neuronas disociadas de los lados control (**A**) y lesionado (**B**) de ratas hemiparkinsonianas (P<0.05). Se muestra el curso temporal de cada experimento (*lado derecho*).

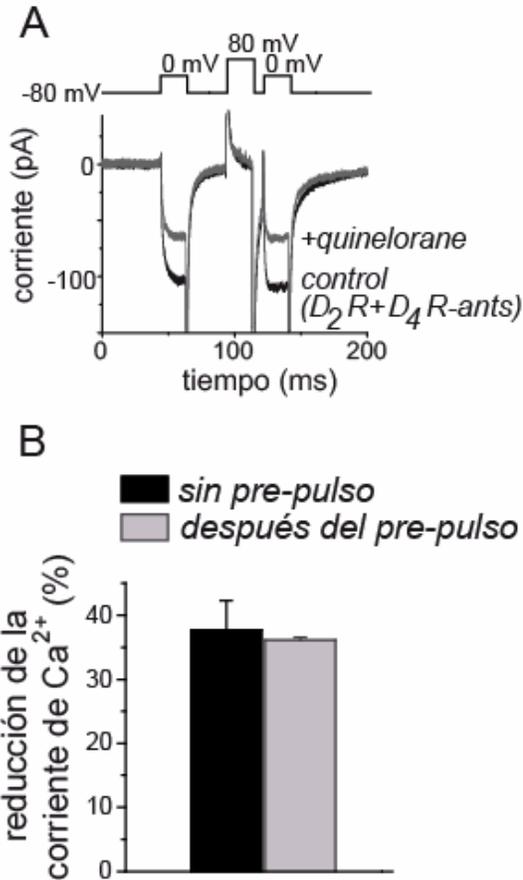
### Mecanismos involucrados en la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por el D<sub>3</sub>R.

Los canales de Ca<sup>2+</sup> son modulados por GPCRs a través de dos mecanismos: uno que depende del voltaje (sensible a la despolarización), es delimitado a membrana e involucra la unión de las subunidades βγ de la proteína G a regiones citoplásmicas del canal; y otro

mecanismo que es mediado por segundos mensajeros que pueden difundir por el citosol y que es independiente del voltaje [59].

Para determinar si el efecto del D<sub>3</sub>R sobre la corriente de Ca<sup>2+</sup> depende del voltaje empleamos el protocolo estándar de pulsos dobles a 0 mV con prepulso intermedio, con el cual se compara la modulación en el primer pulso con la obtenida en el segundo pulso. Éste último está precedido del prepulso: un comando despolarizante a +80 mV (Fig. 8A). En neuronas del lado lesionado, la modulación inducida por el quinelorane (100 μM), en presencia de los antagonistas selectivos para los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>4</sub>R (50 nM de L741,626 y 50 nM de L750,667), no se modifica por el prepulso (Fig. 8A): la amplitud de la corriente de Ca<sup>2+</sup> se reduce 38±5% y 36±1% antes y después del prepulso, respectivamente (Fig. 8B; n = 6; NS). En neuronas del lado control se observó un resultado similar (no mostrado). Estos resultados descartan que la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> mediada por el D<sub>3</sub>R sea regulada por voltaje.

El mecanismo descrito para la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> en NEMs de animales *naive* inicia con la activación de la PLCβ, seguida de la activación de la fosfatasa 2B (PP2B o calcineurina), la cual desfosforila a los canales de Ca<sup>2+</sup> [16,25,115,116] reduciendo así su probabilidad de apertura. Este mecanismo involucra la hidrólisis de fosfoinosítidos por la PLCβ, la formación de IP<sub>3</sub>, la liberación de calcio de pozas intracelulares y la consecuente activación de la Ca-calmodulina con la posterior activación de la calcineurina [16]. En esta tesis confirmamos que en neuronas del lado control y naive, tanto los receptores D<sub>2</sub>R como los D<sub>3</sub>R, modulan la corriente de calcio a través de la activación de la calcineurina (Figs. 9A,B; n=6). En estos experimentos se evaluó la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> en presencia de FK506 1μM, un inhibidor de esta fosfatasa.



**Figura 8.** La modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  por el  $D_3R$  es independiente del voltaje. **A.** Neuronas estriatales disociadas del lado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA fueron sometidas a un protocolo de pulsos dobles, con prepulso antes del segundo pulso (mostrado en la parte superior). La amplitud de la corriente producida por el primer y segundo pulsos despolarizantes a 0 mV (trazo negro) fue equivalente. Se administró quinelorane (100  $\mu$ M) en presencia de antagonistas (ants) selectivos para los receptores  $D_2R$  y  $D_4R$ : 50 nM de L741,626 y L750,667, respectivamente. La disminución de la corriente de  $Ca^{2+}$  fue la misma antes y después del pre-pulso a 80 mV (trazo gris). **B.** Histograma de los resultados obtenidos (n = 6).

Posteriormente se estudiaron los mecanismos involucrados en la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  en las neuronas privadas de DA, o ipsilaterales a la lesión. Primero, mediante un experimento de oclusión farmacológica, se investigó la participación de la PLC. Se usó entonces el activador de la PLC *m*-3M3-FBS (25  $\mu$ M) [117], el cual mimetizó las acciones de los agonistas de la clase  $D_2$ : se observó una reducción del  $57 \pm 6\%$  de la corriente de  $Ca^{2+}$  (Fig. 9C; n=6;  $P < 0.02$ ). Pero además, el efecto del *m*-3M3-FBS ocluyó significativamente la modulación mediada por el agonista al activar a los receptores  $D_2R$  y  $D_3R$ ; la modulación mediada por la activación del  $D_3R$  disminuyó al  $13 \pm 2\%$  (Fig. 9C; n=6; cf., Figs. 5B,C;  $P < 0.05$ ).

También usamos el inhibidor de la PLC, el U73122 (10  $\mu$ M), el cual bloqueó significativamente la modulación mediada por el agonista al activar a los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>3</sub>R (Fig. 9D; n=5; P<0.01). Los análogos inactivos del activador de la PLC, *o*-3M3-FBS (25  $\mu$ M), y del inhibidor de la PLC, U73343 (10  $\mu$ M), no afectaron las respuestas asociadas a los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> (dato no mostrado). La oclusión de la modulación mediada por un activador y el bloqueo de la misma mediada por un inhibidor de la PLC demuestran que en neuronas del lado lesionado, el D<sub>2</sub>R y el D<sub>3</sub>R señalizan a través de una vía que depende de la PLC.

Siguiendo con la vía de señalización previamente descrita (PLC/PP2B, ver arriba), se decidió evaluar la participación de la PP2B: en neuronas privadas de DA, la inhibición de la PP2B con FK506 (1  $\mu$ M) disminuyó la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R a la mitad, quedando en estas condiciones sólo un 16 $\pm$ 4% de la modulación original (Fig. 9E; n=6; P<0.05). La acción del D<sub>2</sub>R fue también afectada de manera significativa (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que aproximadamente la mitad de la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R en neuronas del lado lesionado utiliza la misma vía de señalización que la descrita previamente para los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> en neuronas control o *naive*, vía PLC/PP2B [16]. ¿Pero qué pasa con la modulación restante, aproximadamente 17% de la corriente de Ca<sup>2+</sup>? Es justo la porción que aumenta después de la lesión. Nuestra hipótesis fue que en neuronas deficientes en DA, parte de la modulación requiere de un mecanismo que aparece o se potencia después de la desnervación, un mecanismo que inicia con la activación de PLC pero que es independiente de la PP2B.

El D<sub>3</sub>R señala a través de la vía MAPK-ERK [47,118,119], una vía que se ha observado aumentada después de la desnervación dopaminérgica [94,104]. Sin embargo, cuando la activación de ERK fue bloqueada por el SL327 20  $\mu$ M [120] la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por el D<sub>3</sub>R no fue afectada (Fig. 9F y 10A). En este caso, la disminución de la corriente de Ca<sup>2+</sup> fue 27 $\pm$ 4% (n=5; NS con respecto a condiciones control). El SL327

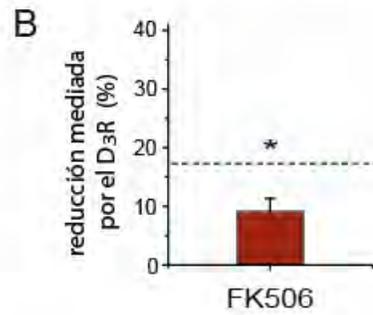
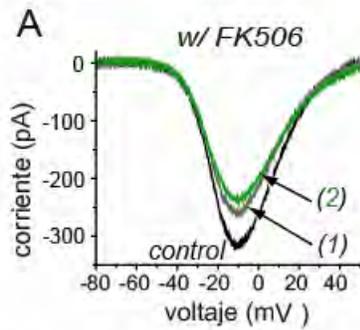
tampoco previno la acción del agonista selectivo del D<sub>3</sub>R, PD128907 5 nM (Fig. 10B; n=10). Aunque en ambos experimentos se observó una disminución de la corriente inducida por el mismo SL327, este efecto se ha reportado con anterioridad y se ha propuesto que la apertura del canal Cav2.2 (N) se favorece por la actividad constitutiva de ERK [121]. Experimentos en neuronas del lado control mostraron resultados similares (no ilustrados). De esta manera, los experimentos descartan la participación de ERK en el mecanismo a través del cual el D<sub>3</sub>R modula la corriente de Ca<sup>2+</sup>.

Después de esta serie de experimentos quedó por dilucidar el mecanismo que explica una fracción sustancial (aprox. la mitad) de la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R en neuronas del lado lesionado. No obstante, se confirmó que dicho mecanismo depende de la PLC y se descartó la participación de: la vía delimitada a membrana, PP2B y ERK.

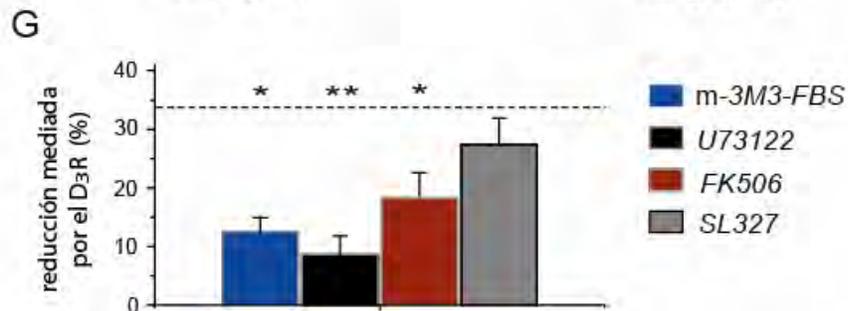
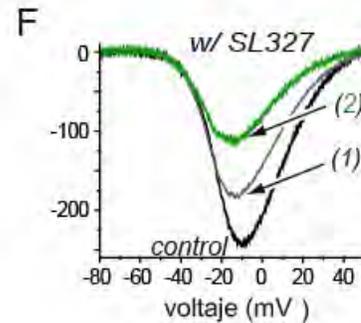
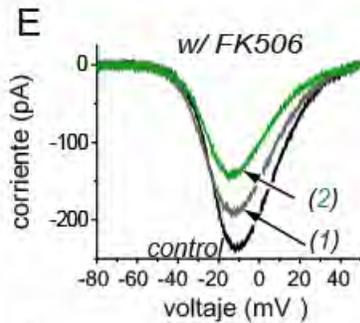
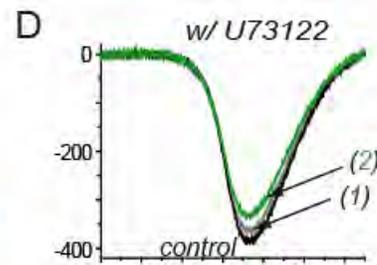
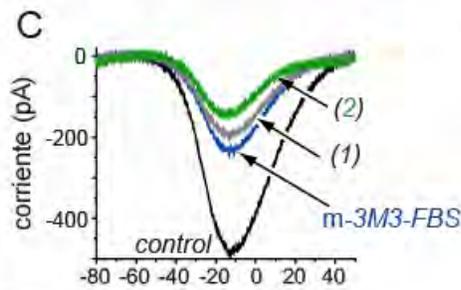
(1): quinolorane + D<sub>3</sub>R-ant + D<sub>4</sub>R-ant

(2): lavado D<sub>3</sub>R-ant

control:

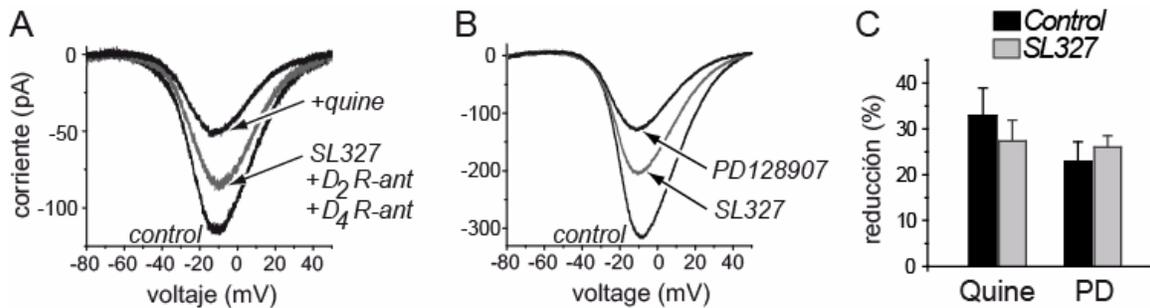


lesionado:



**Figura 9.** La vía de señalización PLC/PP2B contribuye con la mitad de la modulación asociada con el D<sub>3</sub>R en neuronas del lado lesionado. En todos los experimentos las neuronas fueron expuestas al quinolorane 100  $\mu$ M en presencia de los antagonistas para los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> ("D<sub>3</sub>R-ant"= 500 nM U99194A y "D<sub>4</sub>R-ant"= 50 nM L750,667) para activar al D<sub>2</sub>R (1), luego se activó al D<sub>3</sub>R mediante el lavado de su antagonista (2).

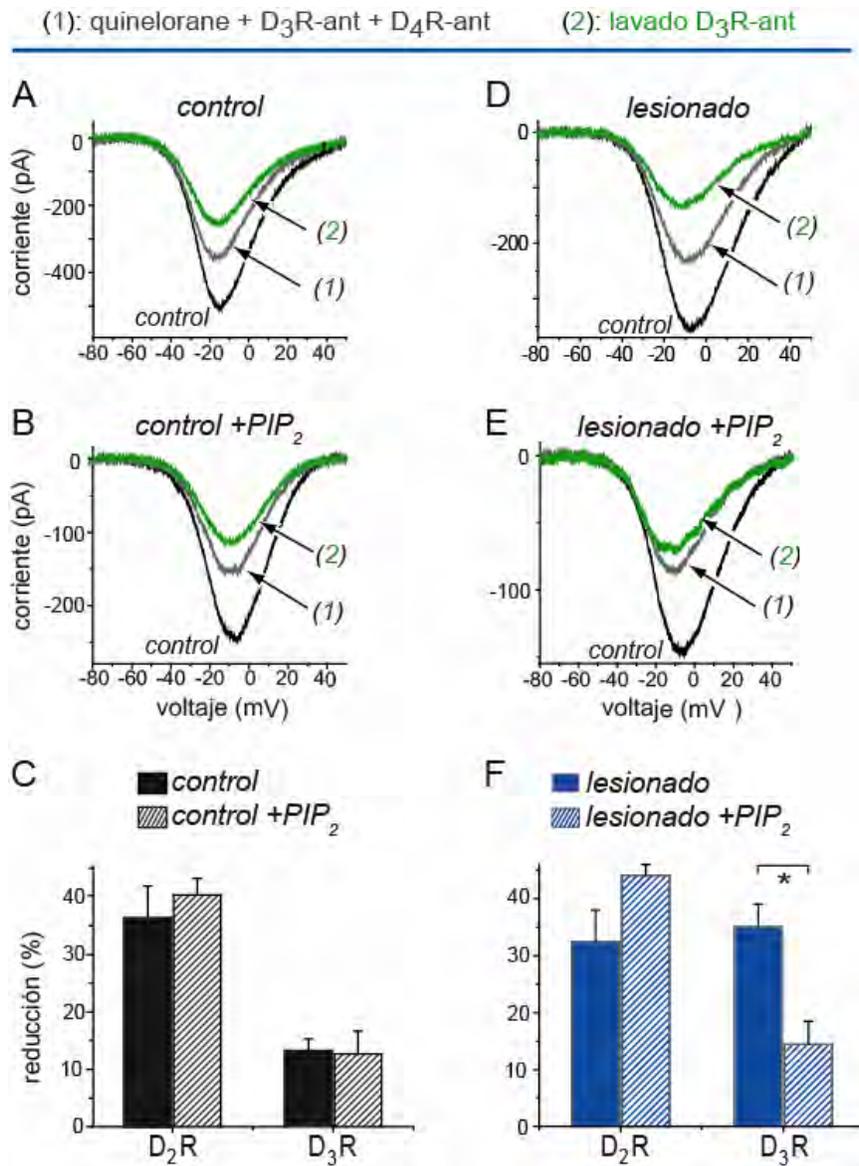
**A,B.** Neuronas del lado control: **(A)** la inhibición de la PP2B con FK506 1  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la modulación del  $\text{D}_2\text{R}$  y del  $\text{D}_3\text{R}$ . **(B)** El histograma muestra la modulación mediada por el  $\text{D}_3\text{R}$  en neuronas expuestas a FK506; se observó una reducción en comparación con lo observado en neuronas registradas en condiciones control (sin FK506; línea punteada;  $*P < 0.05$ ). **C-F.** Neuronas del lado lesionado: **(C)** Tanto la modulación asociada con el  $\text{D}_2\text{R}$  como la correspondiente al  $\text{D}_3\text{R}$  fueron ocluidas por la adición de *m*-3M3-FBS (25  $\mu\text{M}$ ), un activador selectivo de la PLC ( $*P < 0.05$ ); **(D)** de manera similar, ambos efectos fueron bloqueados por el U73122 10  $\mu\text{M}$ , un inhibidor de la PLC ( $**P < 0.01$ ). **(E)** La inhibición de la PP2B con FK506 1  $\mu\text{M}$  afectó la modulación mediada por la activación de los receptores  $\text{D}_2\text{R}$  y  $\text{D}_3\text{R}$  ( $*P < 0.05$ ). **(F)** Por el contrario, el bloqueo en la activación de ERK con SL327 20  $\mu\text{M}$  no afectó la modulación mediada por el  $\text{D}_2\text{R}$  ni la correspondiente al  $\text{D}_3\text{R}$ . **(G)** El histograma muestra la modulación mediada por el  $\text{D}_3\text{R}$  en los experimentos descritos, la cual es comparada con la modulación observada en experimentos realizados bajo condiciones control (sin la exposición a inhibidores/activadores farmacológicos; línea punteada).



**Figura 10.** La inhibición de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{D}_3\text{R}$  es independiente de la activación de ERK. En neuronas del lado deficiente de DA, después de bloquear la activación de ERK con SL327 20  $\mu\text{M}$  y de administrar los antagonistas para los receptores  $\text{D}_2$  y  $\text{D}_4$  (L741,626 y L750,667 50 nM, respectivamente), el  $\text{D}_3\text{R}$  fue activado por 100  $\mu\text{M}$  de quinelorane (quine) **(A)**. Alternativamente, el  $\text{D}_3\text{R}$  fue activado por la adición del agonista selectivo PD128907 (PD) 5 nM **(B)**. **C.** El histograma muestra los resultados de los experimentos descritos: la modulación mediada por el  $\text{D}_3\text{R}$  no se modifica por la adición de SL327 (NS). Note que ambos protocolos de activación del  $\text{D}_3\text{R}$  son diferentes al mostrado en la Fig. 9F y, sin embargo, el resultado es el mismo.

Recientemente se ha descrito que el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) juega un papel importante en la regulación de un gran número de corrientes iónicas [62] (ver Introducción); en particular, corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que involucran a los canales  $\text{Cav}2.1$  (P/Q) y  $\text{Cav}2.2$  (N) [62,64,122]. Por lo anterior, se evaluó si la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  dependiente de la activación de PLC inducida por el  $\text{D}_3\text{R}$  activo era capaz de modular la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para lo cual las neuronas fueron expuestas a concentraciones fisiológicas de  $\text{PIP}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) [62,123] a través

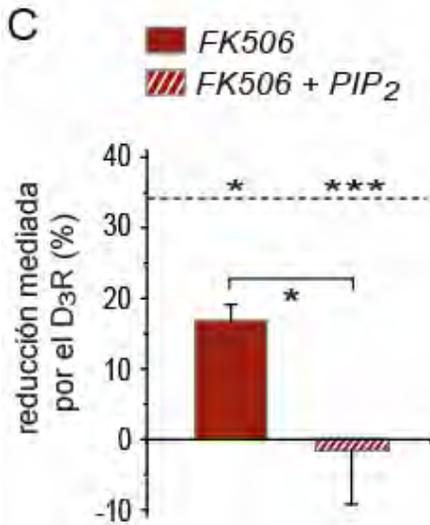
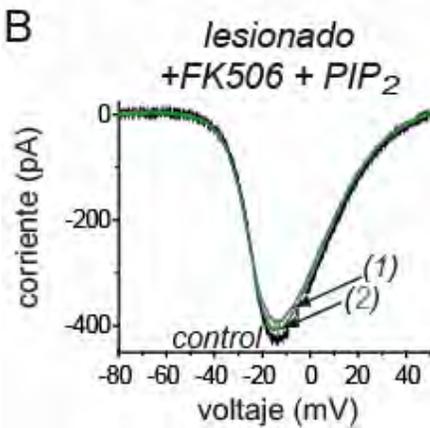
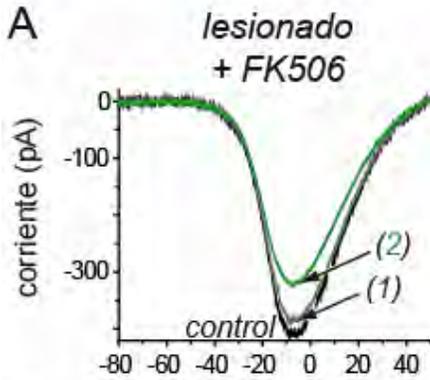
de la pipeta de registro, manteniendo así constantes los niveles intracelulares del fosfoinosítido independientemente de la activación de la PLC. La comparación de las Figs. 11A y B muestra que en neuronas del lado control los efectos asociados con los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> no se ven afectados por la adición de PIP<sub>2</sub> (Fig. 11C; n=13). Por el contrario, la acción D<sub>3</sub>R sobre la corriente de Ca<sup>2+</sup> se reduce a la mitad (15±5%) en neuronas disociadas del estriado deficiente en DA (Fig. 11D-F; n=9; P<0.05), mientras que el efecto del D<sub>2</sub>R no se altera. Estos resultados demuestran que la acción moduladora del D<sub>3</sub>R sobre la corriente de Ca<sup>2+</sup> en neuronas del lado lesionado depende tanto de la activación de la PP2B (la mitad) como de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> (la otra mitad). Además, se muestra que la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> no explica la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por parte del D<sub>2</sub>R, ni en neuronas del lado control [16] ni en las correspondientes al lado lesionado DA.



**Figura 11.** En neuronas estriatales del lado lesionado, pero no del lado control, la modulación dependiente del D<sub>3</sub>R es disminuida por la administración intracelular de PIP<sub>2</sub>. En todos los experimentos las neuronas fueron expuestas al quinolorane (100 μM) en presencia de los antagonistas para los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> ("D<sub>3</sub>R-ant"= 500 nM U99194A y "D<sub>4</sub>R-ant"= 50 nM L750,667, respectivamente) para activar al D<sub>2</sub>R (1), y después permitir la activación del D<sub>3</sub>R mediante el lavado de su antagonista (2). **A,B.** Trazos representativos de la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por la activación de los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>3</sub>R en neuronas del lado control en experimentos en los que se empleó solución interna de registro estándar (**A**) y suplementada con PIP<sub>2</sub> (10 μM) (**B**). **C.** Histograma de los resultados obtenidos en las dos condiciones descritas. **D,E.** Trazos correspondientes a los experimentos con neuronas del lado lesionado; empleando solución interna de registro estándar (**C**) y suplementada con PIP<sub>2</sub> (10 μM) (**D**). **E.** Histograma de los resultados obtenidos en estas dos condiciones (\*P<0.05).

El papel de la PP2B se corroboró en experimentos donde se activó directamente al D<sub>3</sub>R, mediante el uso del quinolorane en presencia de antagonistas para el D<sub>2</sub>R y el D<sub>4</sub>R. Este protocolo alternativo arrojó los mismos resultados: aproximadamente la mitad de la modulación inducida por la activación del D<sub>3</sub>R en neuronas deficientes en DA depende de la activación de la PP2B (usando FK506; Fig. 12A,C; \*P<0.05). Mediante este paradigma de activación del D<sub>3</sub>R, también se observó que al adicionarse extracelularmente FK506 (inhibidor de PP2B) e intracelularmente (en la pipeta de registro) PIP<sub>2</sub> 10 μM, el efecto modulador del D<sub>3</sub>R sobre la corriente de Ca<sup>2+</sup> se elimina completamente (Fig. 12B,C; \*\*\*P<0.001). El histograma de la Fig. 12C resume estos experimentos: los dos mecanismos, la activación de PP2B y la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, explican completamente la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por el D<sub>3</sub>R en NEMs del lado lesionado.

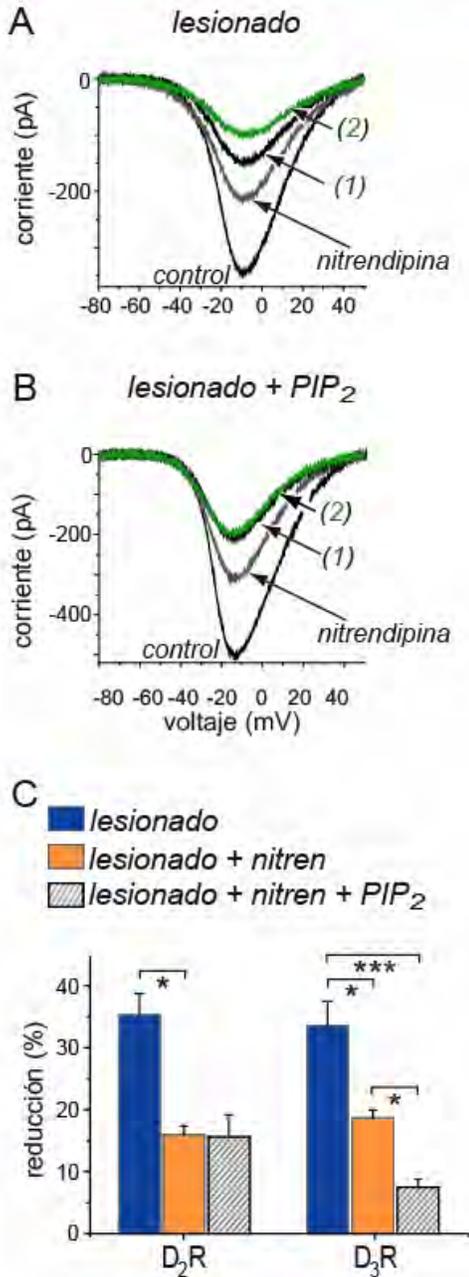
(1): + D<sub>2</sub>R-ant + D<sub>4</sub>R-ant  
 (2): +quinelorane



**Figura 12.** La señalización a través de la PP2B y del PIP<sub>2</sub> comprende toda la modulación asociada con el D<sub>3</sub>R en neuronas privadas de DA. En todos los experimentos las neuronas fueron expuestas a los antagonistas para los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub> ("D<sub>2</sub>R-ant"= 50 nM L741,626 y "D<sub>4</sub>R-ant"= 50 nM L750,667, respectivamente) (1), y posteriormente se adicionó quinelorane 100 μM para activar al D<sub>3</sub>R (2). **A,B.** Trazos representativos de la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por la activación del D<sub>3</sub>R en neuronas del lado lesionado incubadas con FK506 1 μM (**A**) o con FK506 y PIP<sub>2</sub> 10 μM (**B**). **C.** El histograma muestra los cambios observados en la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R en las condiciones descritas; la comparación se realizó con el efecto observado en condiciones control (sin FK506 ni PIP<sub>2</sub>; línea punteada; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001). También se observó diferencia al comparar las dos condiciones experimentales (\*P<0.05).

A diferencia de la señalización que involucra PIP<sub>2</sub>, la activación de la PP2B también la presentan las neuronas del lado control. En neuronas de ratas *naive* la activación de PP2B reduce la corriente de tipo L (Cav1) [16], lo que sugiere que la modulación de estos canales no es modificada por la lesión de la vía nigroestriatal. Para probar esta hipótesis, los canales de Ca<sup>2+</sup> Cav1 fueron bloqueados con nitrendipina (10 μM) antes de activar a los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>. No se observaron diferencias al comparar la corriente inhibida por la nitrendipina en neuronas de los lados control y lesionado: 22±7% and 26±5%, respectivamente. No obstante, la modulación por los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> se redujo aproximadamente a la mitad (P < 0.05; Fig. 13A), lo que indica que ambos receptores modulan al canal Cav1 en neuronas del lado lesionado. De manera importante, la modulación debida al D<sub>3</sub>R fue completamente inhibida cuando además de bloquear los canales Cav1 se incluyó PIP<sub>2</sub> (10 μM) en la pipeta de registro (P < 0.001; Fig. 13B). Éste no fue el caso de la modulación mediada por el D<sub>2</sub>R. El resumen de estos resultados se muestra en el histograma de la Fig. 13C; los datos refuerzan la idea de que la modulación por PIP<sub>2</sub> sólo es evidente después de la desnervación dopaminérgica y sugieren fuertemente que la corriente modulada por la vía de PIP<sub>2</sub> no es de tipo L. Los siguientes experimentos se concentraron en dilucidar el tipo de corriente de Ca<sup>2+</sup> cuya modulación requería de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, esto en NEMs privadas de DA.

(1): quinolorane + D<sub>3</sub>R-ant + D<sub>4</sub>R-ant  
 (2): lavado D<sub>3</sub>R-ant



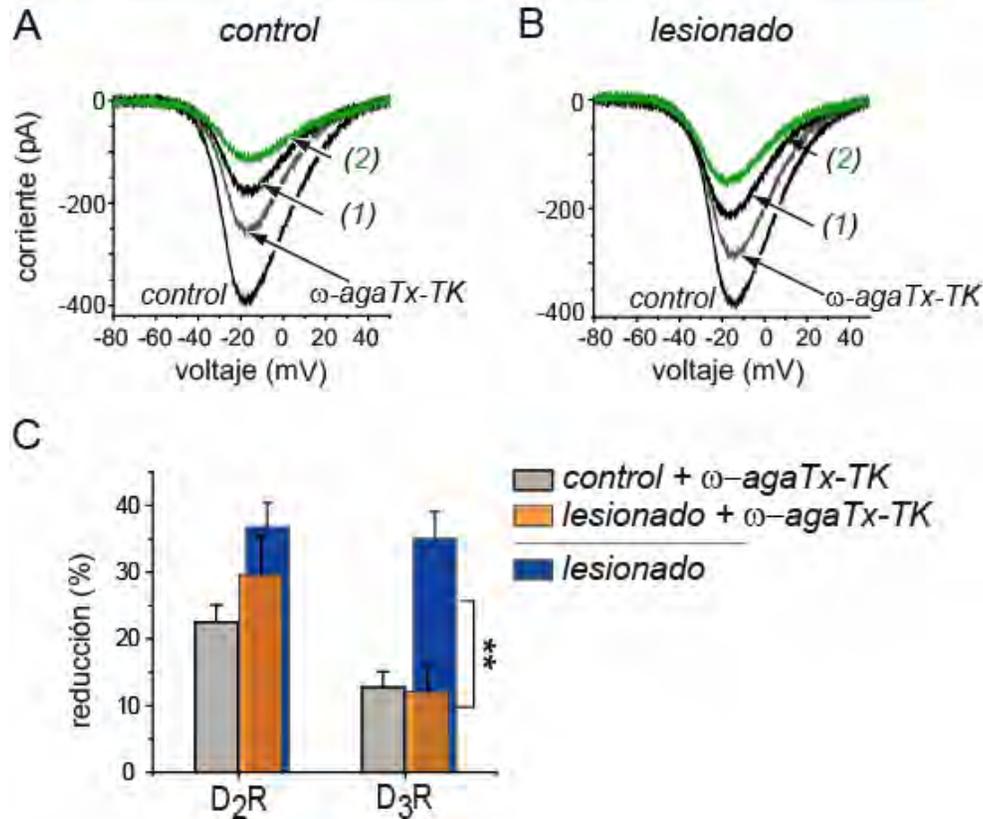
**Figura 13.** La vía de señalización dependiente de PIP<sub>2</sub> observada en NEMs privadas de DA no está asociada con la corriente tipo L. En todos los experimentos las NEMs del lado lesionado fueron expuestas a quinolorane (100 μM) en presencia de los antagonistas para los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> ("D<sub>3</sub>R-ant"= 500 nM U99194A y "D<sub>4</sub>R-ant"= 50 nM L750,667, respectivamente), para activar al D<sub>2</sub>R (1); posteriormente se interrumpió la aplicación del antagonista para el D<sub>3</sub>R, permitiendo así la activación de este receptor (2). **A,B.** Previo a la activación de los receptores de DA, los canales Ca<sub>v</sub>1 fueron bloqueados al administrar nitrendipina (10 μM). Se muestran trazos representativos de la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por la activación consecutiva del D<sub>2</sub>R y el D<sub>3</sub>R en registros en donde se empleó solución interna estándar (**A**) o suplementada con PIP<sub>2</sub> 10 μM (**B**). **C.** El histograma muestra los cambios observados en la modulación mediada por ambos receptores; la comparación incluye los resultados obtenidos en experimentos control (sin nitrendipina ni PIP<sub>2</sub>; barra azul; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001).

## La supersensibilidad del D<sub>3</sub>R esta asociada a la modulación de los canales Ca<sub>v</sub>2.1

Las NEMs expresan diferentes tipos de canales de Ca<sup>2+</sup>: Ca<sub>v</sub>1.2,3-L<sub>C,D</sub>, Ca<sub>v</sub>2.1-3 -N, P/Q, R [18,108,124]. En NEMs de ratas adultas se ha determinado que los D<sub>2</sub>R<sub>class</sub> modulan principalmente los canales Ca<sub>v</sub>1 y Ca<sub>v</sub>2.1 [16,18,109]. Recientemente se reportó que los canales Ca<sub>v</sub>2.1 son modulados por la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> inducida por la activación de los receptores muscarínicos M<sub>1</sub> [65], lo que nos llevó a evaluar si este canal se modulaba por el D<sub>3</sub>R. Con este fin, se realizaron experimentos de oclusión: se estudió la modulación mediada por los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> una vez que los canales Ca<sub>v</sub>2.1 habían sido bloqueados por la ω-agatoxina-TK (ω-agaTx-TK, 400 nM). La magnitud de la corriente bloqueada por la ω-agaTx-TK fue similar en las neuronas de los lados control y lesionado: 39±5% and 33±4%, respectivamente; este resultado confirma que la densidad de canales Ca<sub>v</sub>2.1 no es afectada por la desnervación dopaminérgica (ver Fig. 3). La adición de ω-agaTx-TK no modificó los efectos de los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> en neuronas del lado control (Fig. 14A; n=7). Por el contrario, en las neuronas del lado lesionado el aumento en la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R no se observó tras la administración de ω-agaTx-TK (Fig. 14B). La magnitud de la modulación (12±4%) no difirió de la observada en neuronas del lado control (13±2%), pero fue significativamente menor a la observada en experimentos previos (33%, *c.f.* Fig. 4B,C), que no incluían la adición de ω-agaTx-TK (Fig. 14C; n=7; \*\*P<0.01). Estos resultados sugieren que el incremento en la modulación asociada con el D<sub>3</sub>R en las neuronas del lado lesionado se debe a su acción sobre los canales Ca<sub>v</sub>2.1. Por otro lado, no se observaron cambios al bloquear los canales tipo N (Ca<sub>v</sub>2.2) con ω-conotoxina GVIA 1 μM (dato no mostrado).

En conjunto, estos datos muestran que en neuronas del lado lesionado el D<sub>3</sub>R modula los canales Ca<sub>v</sub>1 y Ca<sub>v</sub>2.1. Los canales Ca<sub>v</sub>1 son regulados por una vía que depende de la PP2B, de manera similar a lo observado en neuronas del lado control y de estriado *naive* [16]; mientras que la modulación de los canales Ca<sub>v</sub>2.1 involucra la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> y está presente únicamente en las NEMs del lado lesionado.

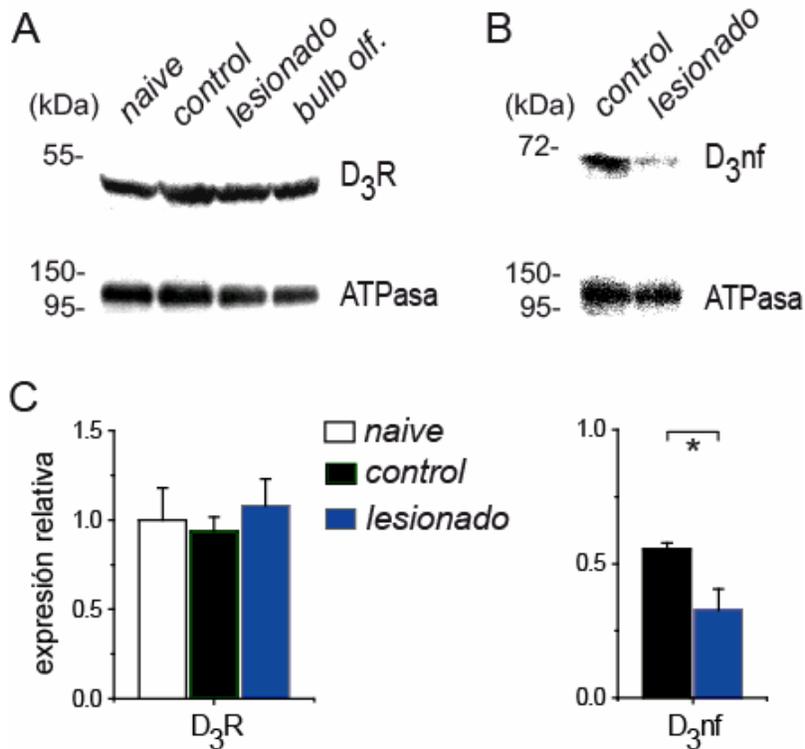
(1): quinolorane + D<sub>3</sub>R-ant + D<sub>4</sub>R-ant (2): lavado D<sub>3</sub>R-ant



**Figura 14.** El D<sub>3</sub>R modula al canal de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q (Ca<sub>v</sub>2.1) en neuronas privadas de DA. **A,B.** En todos los experimentos las NEMs son expuestas a quinolorane (100  $\mu$ M) en presencia de los antagonistas para los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> ("D<sub>3</sub>R-ant"= 500 nM U99194A y "D<sub>4</sub>R-ant"= 50 nM L750,667, respectivamente), para activar al D<sub>2</sub>R (1); posteriormente, se interrumpe la aplicación del antagonista para el D<sub>3</sub>R, consiguiendo así la activación de este receptor (2). **A,B.** Previo a la activación de los receptores de DA, los canales Ca<sub>v</sub>2.1 fueron bloqueados mediante la administración de  $\omega$ -agatoxina-TK ( $\omega$ -agaTx-TK; 400 nM). Se muestran trazos representativos de la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por la activación consecutiva del D<sub>2</sub>R y el D<sub>3</sub>R en neuronas del lado control (**A**) y lesionado (**B**). **C.** El histograma muestra el porcentaje de la corriente modulada por los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>3</sub>R después de la adición de  $\omega$ -agaTx-TK. En estas condiciones ya no se observa diferencia al comparar las neuronas de los lados control y lesionado. Sin embargo, en neuronas del lado lesionado la modulación mediada por el D<sub>3</sub>R se reduce en comparación con lo observado en estas neuronas durante registros en condiciones control (sin  $\omega$ -agaTx-TK; barra azul; \*\**P* < 0.01).

## Expresión del D<sub>3</sub>R

En paralelo a los experimentos de electrofisiología, se realizaron inmunodetecciones tipo “Western” a partir de extractos proteicos de membrana de tejido estriatal. Al comparar las muestras de hemisferios cerebrales *naive*, control y lesionado, se observó una expresión similar de una proteína de ~45 kDa, que corresponde a la masa molecular del *core* proteico del D<sub>3</sub>R (Fig. 15A,C). Sin embargo, la expresión de la variante D<sub>3</sub>nf, de ~71 kDa [28] y que se ha sugerido regula negativamente al D<sub>3</sub>R [125,126], fue significativamente menor en el estriado privado de DA (Fig. 15B,C; \**P*<0.05). La especificidad de los anticuerpos empleados fue demostrada mediante ensayos con homogenados de ojo de rata, un tejido que no expresa D<sub>3</sub>R [127] (ver apéndice).



**Figura 15.** Expresión del D<sub>3</sub>R y de la variante D<sub>3</sub>nf. Extractos proteicos (40-50 µg) de membrana del estriado dorsal resueltos por SDS-PAGE 12%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y probados con anticuerpos anti-D<sub>3</sub>R (A), anti-D<sub>3</sub>nf (B) y anti-ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (subunidad α). C. Resultados del análisis densitométrico en cada condición; en (A), el bulbo olfativo se usó como control positivo. La señal obtenida con el anticuerpo anti-ATPasa (~110 kDa) se usó para normalizar los resultados. Así, el nivel de expresión se definió como el cociente señal del receptor/señal de ATPasa. Se muestran resultados representativos de cinco experimentos independientes; en cada uno se mezclaron las muestras obtenidas de al menos tres ratas.

## 9. Discusión

Los resultados de este estudio muestran que 1) en NEMs privadas de DA la supersensibilidad de los  $D_2R_{\text{clase}}$  se ve reflejada en la modulación que ejercen estos receptores sobre la corriente de  $Ca^{2+}$ . Reportamos por lo tanto un correlato molecular de la supersensibilización de estos receptores usando un blanco que impacta directamente la excitabilidad neuronal. 2) En parte, la supersensibilidad de los  $D_2R_{\text{clase}}$  se debe a un aumento en la modulación mediada por el  $D_3R$ , lo cual ocurre en los dos tipos de NEMs, las estriatonigrales y las estriatopalidales (vía directa e indirecta, respectivamente). 3) El aumento en la función del  $D_3R$  se asocia con la modulación del canal  $Ca_v2.1$  a través de la hidrólisis de  $PIP_2$  catalizada por la PLC, una vía de señalización no descrita anteriormente para este receptor. 4) Si bien no se observaron cambios en la expresión del  $D_3R$  en el estriado desnervado, se detectó una disminución en la expresión de la variante alternativa  $D_{3nf}$ .

### Supersensibilidad del $D_3R$

El correlato electrofisiológico (modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$ ) de la supersensibilidad de los  $D_2R_{\text{clase}}$  indica que este fenómeno es capaz de alterar los mecanismos generadores de la excitabilidad en las NEMs. Un hallazgo similar ha sido reportado en neuronas disociadas del globo pálido de ratas hemiparkinsonianas [128]. Adicionalmente, en nuestro estudio disecamos farmacológicamente la contribución de cada receptor de la clase  $D_2$ ; algo que no se había reportado por falta de antagonistas selectivos. El método empleado fue robusto y arrojó resultados similares independientemente del orden de aplicación y tipo de antagonistas empleados. Lo anterior sugiere fuertemente que fue posible separar las acciones de diferentes tipos de receptor de la clase  $D_2$  en una misma neurona. Del resultado de estos experimentos se puede concluir que al estudiar la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  la supersensibilidad de los  $D_2R_{\text{clase}}$  se debe en gran parte a un incremento en la actividad del  $D_3R$  en las neuronas del lado lesionado. Apoyan esta idea: 1) la aparición de un tercer sitio de acción en la curva C-R

con un valor de  $EC_{50}$  (0.8 nM) similar a la afinidad reportada para el  $D_3R$  (~1 nM, [35,110]), y 2) el incremento en la  $E_{max}$  de la curva C-R de neuronas privadas de DA (13%) que coincide con el aumento de la modulación mediada por el  $D_3R$  (16%). Además, estudios previos con un enfoque bioquímico han sugerido que las acciones del  $D_3R$  (*e.g.* regulación de la expresión génica y modulación de la liberación de acetilcolina) aumentan en animales con deficiencia de DA [53,129-131].

Al comparar reportes anteriores [34,132-137], en lo referente a cambios en la expresión del  $D_3R$  después de la lesión con 6-OHDA aún existe controversia. Al parecer, las técnicas empleadas en estos estudios (unión de ligandos radiactivos y detección del RNAm por hibridización *in situ*) no permiten discernir entre la contribución pre- y post-sináptica (terminales dopaminérgicas [138,139] y NEMs [113], respectivamente), lo que dificulta la interpretación de los datos [34,132-137]. A diferencia de estos enfoques, en nuestros experimentos el estudio de la función del  $D_3R$  está limitado a la post-sinapsis: las NEMs.

El uso del agonista selectivo para el  $D_3R$ , PD128907, permitió confirmar la presencia de este receptor tanto en neuronas del lado control como del lado lesionado. Corroboró además que el porcentaje de neuronas que expresan  $D_3R$  no se modifica por la lesión. No obstante, nuestro estudio se basó en el uso de antagonistas: en la mayor parte de los experimentos la activación selectiva del  $D_3R$  se conseguía mediante la aplicación de quinolorane en presencia de antagonistas para los receptores  $D_2R$  y  $D_4R$ , o por el mismo quinolorane una vez que se interrumpía el bloqueo selectivo del  $D_3R$ . La preferencia por estas estrategias farmacológicas se justifica principalmente por reportes recientes que muestran que algunos agonistas del  $D_3R$  [140], entre ellos el PD128907 [141], presentan "*selectividad funcional*". Este fenómeno se refiere a que la vía de señalización activada por un receptor depende del agonista empleado [142]. Se ha demostrado que el quinolorane y el PD128907 presentan diferente *selectividad funcional* [141], lo que podría explicar por qué con este último no se detecta la supersensibilidad del  $D_3R$  en neuronas del lado lesionado. Independientemente de la

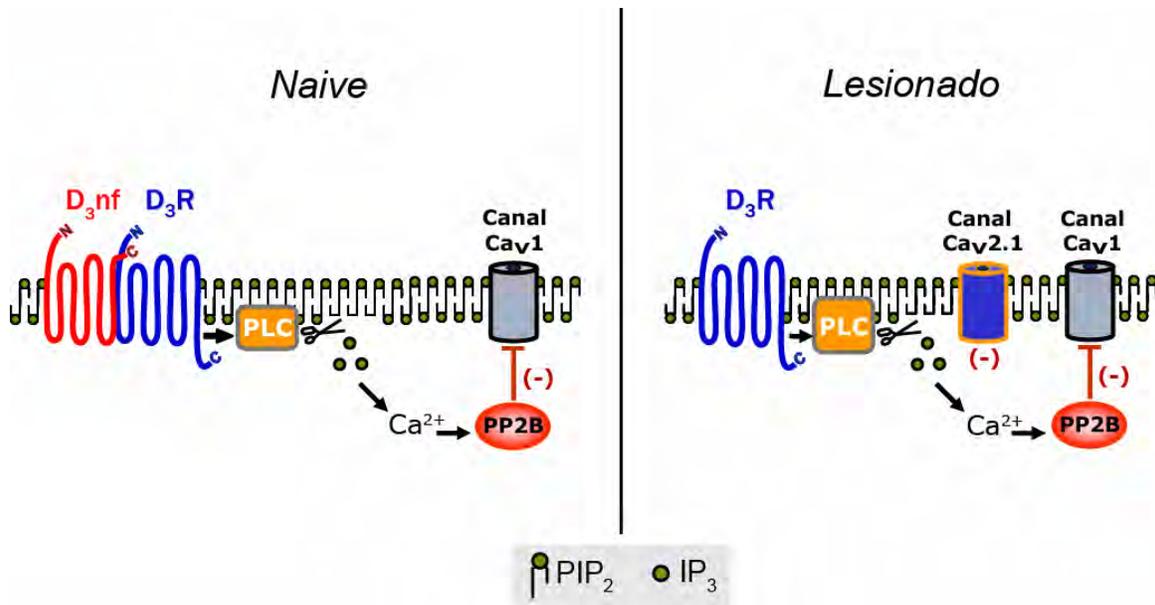
variabilidad en las respuestas, consideramos importante que futuros estudios evalúen el efecto de diferentes agonistas para el D<sub>3</sub>R, incluyendo la misma DA, sobre la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup>. Actualmente se dispone de nuevos agonistas con mayor selectividad y potencia para el D<sub>3</sub>R, que incluso se emplean en el tratamiento de la EP [143].

Nuestros datos muestran que la supersensibilidad del D<sub>3</sub>R ocurre principalmente en neuronas de la vía indirecta, pero también en una fracción de neuronas de la vía directa (aprox. 30%). De manera interesante, en los dos tipos neuronales se observó un cambio similar en la actividad del D<sub>3</sub>R después de la lesión de la SNc. Esto, sin embargo, no quiere decir que las consecuencias sean las mismas en cada vía, lo cual es evidente si tomamos en cuenta que se trata de poblaciones celulares distintas, con diferencias en el patrón de expresión genético, las propiedades electrofisiológicas y los sitios de proyección (ver introducción).

La curva C-R obtenida con neuronas del lado lesionado muestra además que las IC<sub>50</sub> de los otros sitios disminuyen después de la desnervación dopaminérgica, por lo que no se descarta que ocurran cambios en los receptores D<sub>2</sub>R y D<sub>4</sub>R que impacten otras funciones neuronales [102,112]: otros blancos de la DA en las NEMs podrían estar afectados por la sensibilización de estos receptores (canales de sodio, potasio, canales activados por ligando, etc.). Es claro que son necesarios estudios adicionales para esclarecer este punto.

La ausencia de cambios en la densidad de corriente y en la contribución relativa de cada tipo de canal de Ca<sup>2+</sup> después de la lesión de la vía nigroestriatal apoya la idea de que el aumento en la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> se debe a una modificación en la actividad del D<sub>3</sub>R. La actividad de los GPCRs puede ser regulada por diferentes mecanismos, como la formación de dímeros y heterooligómeros que influye de manera cuantitativa (p. ej. cambios en la afinidad) y/o cualitativa (cambios en las vías de señalización) en los efectos de estos receptores. Este tipo de modulación se ha observado en el caso del D<sub>3</sub>R [144-147]. En

particular, se ha reportado que la formación de heterómeros con la variante D<sub>3</sub>nf disminuye la actividad del D<sub>3</sub>R [125,126]. Nuestros datos muestran que la deficiencia de DA conduce a un desequilibrio en la expresión del D<sub>3</sub>R y de su variante D<sub>3</sub>nf: mientras que no se observan cambios en la expresión del D<sub>3</sub>R, la expresión de la variante D<sub>3</sub>nf disminuye, lo que explicaría el aumento en la actividad del D<sub>3</sub>R. De manera interesante, lo contrario se ha observado en pacientes con esquizofrenia (un estado de hiperdopaminergia), en donde la expresión del D<sub>3</sub>nf se incrementa [148]. Más aún, Richtand et al. (2010) [149], reportaron recientemente que la relación D<sub>3</sub>R/D<sub>3</sub>nf es modulada en diferentes áreas del cerebro por la propia DA: al bloquear farmacológicamente la estimulación del D<sub>3</sub>R la expresión de su RNAm no cambia, pero los niveles del RNAm del D<sub>3</sub>nf disminuyen durante este estado de hipodopaminergia [149], lo que concuerda con nuestros resultados. Con base en esto, proponemos que el aumento en la función del D<sub>3</sub>R en NEMs privadas de DA se debe, al menos en parte, a una menor interacción entre el D<sub>3</sub>R y su variante D<sub>3</sub>nf (Fig. 16). Estudios posteriores, que incluyan experimentos de co-inmunoprecipitación y el uso de nuevas tecnologías como el FRET (*Förster resonance energy transfer*), podrán confirmar la idea que proponemos: los niveles de DA regulan la dinámica de formación del heterómero D<sub>3</sub>R-D<sub>3</sub>nf y/o la interacción del D<sub>3</sub>R con otros GPCRs.



**Figura 16.** Modelo propuesto para explicar los cambios que ocurren en la actividad del  $D_3R$  después de la desnervación dopaminérgica. Cuando los niveles de DA se encuentran en rangos considerados normales, el  $D_3R$  modula los canales  $Ca_v1$  (tipo L) mediante la vía de señalización PLC/ $IP_3$ / $Ca^{2+}$ Calmodulina/PP2B. En estas condiciones existe una interacción entre el  $D_3R$  y la variante  $D_3nf$  (izquierda). Una vez que los niveles estriatales de DA se reducen de manera crónica por la lesión de la vía nigroestriatal, la interacción  $D_3R$ - $D_3nf$  se afecta negativamente. Esto lleva a un incremento en la función del  $D_3R$ : el  $D_3R$  continúa regulando a los canales  $Ca_v1$  pero además, inhibe a los canales  $Ca_v2.1$  (P/Q). Se propone que el  $D_3R$  "libre de  $D_3nf$ " se redistribuye en la membrana de las NEMs privadas de DA. Esto lo sitúa a corta distancia del canal  $Ca_v2.1$  y permite que el canal sea afectado por la hidrólisis de  $PIP_2$  y disminuya su probabilidad de apertura una vez que la PLC es activada por el  $D_3R$  (derecha).

### Hidrólisis de $PIP_2$ : un mecanismo para inhibir la corriente de $Ca^{2+}$

Los mecanismos de transducción de señales descritos para el  $D_3R$  involucran la participación de múltiples moléculas: ciclasa de adenilato, PKA, PKB/Akt, PKC, PLC, PLD y ERK [47,119,150-153]. En nuestro estudio, el aumento en la actividad del  $D_3R$  se encontró asociado con una vía de señalización diferente: la hidrólisis de  $PIP_2$ . El blanco molecular de esta vía de señalización fue el canal  $Ca_v2.1$ . Esta vía de señalización no se había descrito asociada con la modulación dopaminérgica de la corriente de  $Ca^{2+}$ , por lo que se sugiere que se desarrolla como parte de los cambios que ocurren en las NEMs debidos al déficit de DA.

En neuronas privadas de DA, la señalización del D<sub>3</sub>R mediada por la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> podría favorecerse por un aumento en la disponibilidad de este fosfoinosítido. Se ha sugerido que el acceso al PIP<sub>2</sub> es controlado por proteínas, como las MARCKS (*myristoylated alanine-rich-C-kinase substrate*), que se unen por interacciones electrostáticas a la membrana [62]. Estas proteínas liberan al PIP<sub>2</sub> cuando se eleva la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> [123]. Dado que las NEMs se encuentran sobreexcitadas como resultado de la desnervación dopaminérgica [89,154,155], en estas condiciones se proveería al D<sub>3</sub>R de una mayor cantidad de moléculas de PIP<sub>2</sub>, y así la activación de la PLC por el D<sub>3</sub>R induciría una disminución de la corriente Cav2.1. Sin embargo, este mecanismo no se asoció con la activación del D<sub>2</sub>R (un receptor que también activa a la PLC), ni en neuronas del lado control ni en las obtenidas del lado lesionado. Esto sugiere que ocurre una redistribución diferencial de los receptores durante la supersensibilización inducida por desnervación; este fenómeno se ha descrito previamente [92]. En apoyo a estas ideas y al modelo basado en la proximidad del D<sub>3</sub>R y el canal Cav2.1 (Fig. 16), se ha observado que la interacción D<sub>3</sub>R-D<sub>3</sub>nf altera la distribución del D<sub>3</sub>R [126].

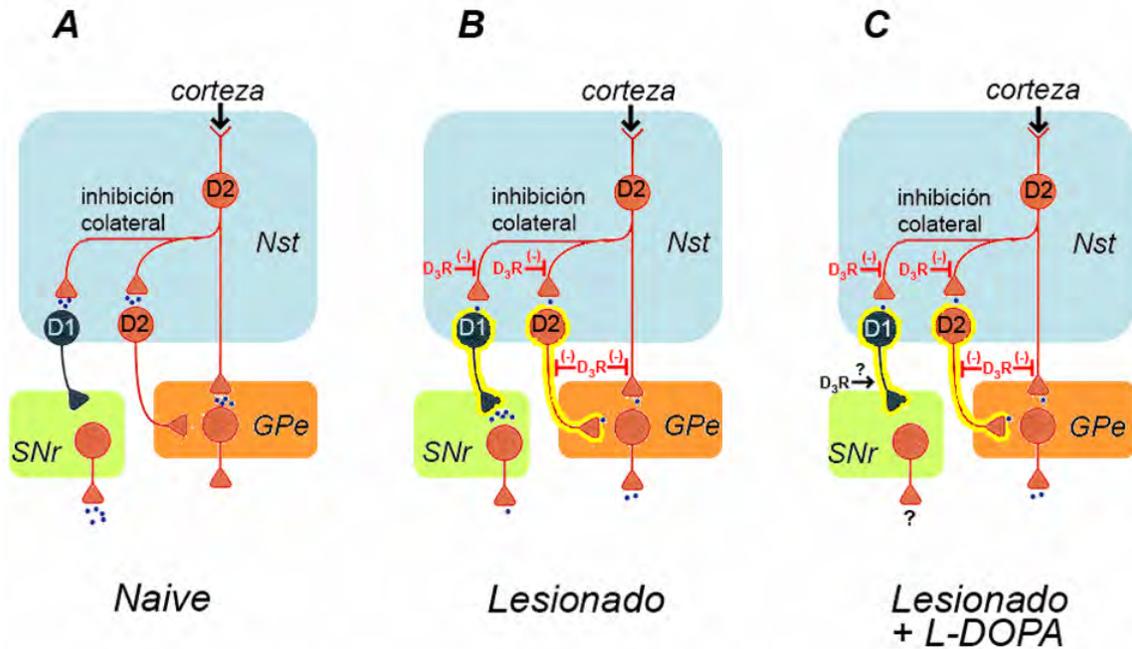
## Consecuencias funcionales

En las terminales sinápticas de las NEMs la liberación de GABA depende de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales Cav2.1, los cuales son regulados por los D<sub>2</sub>R<sub>clase</sub> [18]. Aún falta por demostrarse la participación del D<sub>3</sub>R en esta función. Falta también conocer el impacto que tiene la supersensibilidad del D<sub>3</sub>R sobre el funcionamiento del circuito estriatal. Lo anterior deja ver las limitaciones de nuestro enfoque experimental que, si bien nos permite estudiar los cambios moleculares y funcionales asociados con un receptor presente en una neurona que incluso puede ser tipificada (ratones BAC, RT-PCR de célula única), pierde la sinapsis y más aún, las interacciones dentro de su circuito. Este hecho plantea *perspectivas* para el presente estudio: queda por estudiarse la relevancia de la supersensibilidad del D<sub>3</sub>R en la transmisión sináptica que establecen las NEMs, tanto con las neuronas del GPe (vía indirecta) y la SNr (vía directa), así como entre las mismas NEMs en el Nst (inhibición

colateral) (Figura 17). Nuestro laboratorio cuenta con la infraestructura y la experiencia necesarias para realizar experimentos que evalúen cambios en la transmisión sináptica, los cuales se realizarían en rebanadas de cerebro de animales hemiparkinsonianos. Adicionalmente, se podrían realizar registros de fluorescencia de  $Ca^{2+}$  para conocer la participación del  $D_3R$  (con el uso de agonistas y antagonistas) en la dinámica del circuito estriatal.

Por el momento nuestros datos pueden ser analizados en el contexto de la literatura enfocada en esta área. Así, asumiendo que en la regulación de los canales  $Ca_v2.1$  mediada por los  $D_2R_{clase}$  en las terminales sinápticas [18] participa el  $D_3R$ , lo cual es muy probable, podemos predecir que la sobreinhibición de los canales  $Ca_v2.1$  por parte del  $D_3R$  supersensibilizado llevaría a una disminución en la liberación de GABA. En lo referente a las consecuencias que se observarían en el circuito, nuestra *hipótesis* es la siguiente: en el hemisferio lesionado, la activación del  $D_3R$  modularía en sentido negativo principalmente la inhibición colateral y la transmisión GABAérgica que proyecta hacia la vía indirecta. Es importante subrayar que la disminución en la inhibición colateral es una de las principales alteraciones del circuito estriatal en modelos de la EP [156]. Si nuestra propuesta es correcta, la supersensibilidad del  $D_3R$  actuaría como un mecanismo compensatorio para facilitar los movimientos, aún cuando los niveles de DA sean mínimos, ya que se ha observado que éste es el único receptor que permanece activado (parcialmente) después de una reducción drástica en los niveles cerebrales de catecolaminas [132]. La figura 17 ilustra la idea que proponemos: la sobreinhibición de los canales  $Ca_v2.1$  por el  $D_3R$  supersensibilizado reduciría la liberación de GABA, disminuyendo así la inhibición colateral y por ende aumentando la transmisión hacia ambas vías de los GB (directa e indirecta). Al mismo tiempo, al actuar sobre la liberación de GABA en el GPe (vía indirecta), el  $D_3R$  supersensibilizado se opondría a la activación de la vía indirecta (que reprime los movimientos), que se encuentra sobreactivada en la EP [7]. Esto último apoya el uso de agonistas  $D_3R$  en el tratamiento de la EP [143].

Aún más, el papel del D<sub>3</sub>R en los cambios patológicos que ocurren en los GB se extiende a las discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA: en modelos de la EP, se ha observado que la L-DOPA induce la expresión del D<sub>3</sub>R específicamente en neuronas de la vía directa, lo cual no sucede en presencia de un antagonista para los D<sub>1</sub>R<sub>clase</sub> [133,136,157,158]. De manera importante, el aumento en la expresión del D<sub>3</sub>R en las neuronas estriadales se ha asociado con el desarrollo de discinesias [159]. Aunque no se conoce el mecanismo de esta asociación, se ha reportado que en neuronas estriadales la interacción física entre el D<sub>3</sub>R y el D<sub>1</sub>R (*heterodímeros*) aumenta la afinidad [147] y la señalización [146] de este último. De acuerdo con lo anterior, la L-DOPA potencia la actividad de las NEMs de la vía directa, facilitando así los movimientos. Sin embargo, pensamos que sería necesario revertir los cambios que tuvieron lugar como consecuencia de la desnervación dopaminérgica (*i.e.* la supersensibilidad del D<sub>3</sub>R presente en las neuronas de la vía indirecta y la deficiencia en la inhibición colateral), de lo contrario las señales provenientes de la corteza se amplificarían al pasar por los GB y no serían depuradas; en otras palabras, las discinesias se originarían por un filtrado deficiente de los comandos corticales (Figura 17). Es necesario investigar la validez de estos argumentos. Una primera aproximación sería estudiar la modulación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> por el D<sub>3</sub>R en NEMs obtenidas de ratas hemiparkinsonianas tratadas con L-DOPA.



**Figura 17.** Modelo propuesto para explicar el papel del  $D_3R$  en el funcionamiento de los GB después de la desnervación dopaminérgica. (A) En condiciones fisiológicas, las NEMs, principalmente de la vía indirecta ( $D_2R$ ) [156], inhiben lateralmente a otras NEMs dentro del mismo neostriado (Nst). Se ha propuesto que esto ayuda a filtrar la información que llega de la corteza. Note que de esta manera sólo se permite la salida de la información proveniente de la neurona ubicada en la parte superior de la figura. (B) La supersensibilización del  $D_3R$  disminuiría la inhibición lateral y en consecuencia se incrementaría la actividad del resto de las neuronas (indicado por el relieve amarillo en las NEMs). Pero, al mismo tiempo, se afectaría el flujo de las señales hacia la vía indirecta. Estos cambios modificarían la salida de la información en ambas vías. Note las diferencias en la liberación de GABA (puntos azules) en las neuronas de la sustancia negra reticular (SNr) y el globo pálido externo (GPe) al comparar (A) y (B). (C) Si la L-DOPA no revierte los cambios que ocurren en el estriado desnervado, pero en cambio aumenta la expresión del  $D_3R$  en las NEMs de la vía directa, el funcionamiento del circuito seguiría alterado (ver texto).

Por otro lado, en el soma de las NEMs, la inhibición de los canales  $Ca_v2.1$  induce una disminución de las corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$  que participan en la generación del postpotencial hiperpolarizante [160]; a este nivel, la actividad incrementada del  $D_3R$  alteraría el patrón de disparo de estas neuronas. En conjunto, los efectos asociados con la supersensibilidad del  $D_3R$  explicarían, al menos en parte, la sobreexcitabilidad observada en las NEMs deficientes de DA [89,155,161].

La supersensibilidad de los  $D_2R_{clase}$  es parte de los cambios que se ha sugerido, actúan de manera homeostática e intentan compensar el déficit de DA que ocurre en la EP y en modelos experimentales de la misma. Estos cambios compensatorios incluyen la supersensibilidad del  $D_3R$  que se describe en el presente trabajo, que ocurriría de manera paralela al brote de terminales axónicas (*sprouting*) en la vía nigroestriatal [162]. De manera interesante, evidencia reciente muestra que la activación farmacológica del  $D_3R$  incrementa la neurogénesis en la SNc [163]. Estos datos resaltan el papel del  $D_3R$  en procesos que mantienen el equilibrio en los circuitos que constituyen los ganglios basales.

En general, las adaptaciones homeostáticas descritas se han observado en modelos de la EP, principalmente el que resulta de la lesión inducida por 6-OHDA. La administración de 6-OHDA en la SNc induce una degeneración rápida de la gran mayoría de las neuronas DA de este núcleo. Esta degeneración difiere sustancialmente de la pérdida neuronal lenta y progresiva que ocurre en la EP. Queda entonces por dilucidarse la relevancia de los datos generados en este modelo de la EP al compararse con una desnervación dopaminérgica crónica.

En estado basal, la concentración extracelular de DA en el estriado es aproximadamente 5-10 nM [25,164]. Como resultado de su alta afinidad por la DA ( $\approx 25$  nM, [34,45,165]), en esta condición una proporción de receptores tipo  $D_3$ , pero escasos  $D_2$ , se encuentra ocupada por el ligando endógeno [132]. Se ha propuesto que el  $D_3R$  actúa como un filtro que permite únicamente el paso de estímulos que superan cierto umbral [166], aquellos en donde los niveles de DA incrementan y se consigue la activación de los receptores tipo  $D_1$ ; esto ayudaría a distinguir la activación tónica de la activación dinámica. La idea anterior se refuerza al observar que la activación post-sináptica del  $D_3R$  disminuye la actividad motora espontánea [167,168] e inducida por contexto [169], por amfetamina [167] o por agonistas  $D_1R$  [170]. Debido a su alta afinidad, el  $D_3R$  sería el principal encargado de percibir cambios en el nivel tónico de DA, como el que ocurre al perderse las neuronas dopaminérgicas. El

papel del D<sub>3</sub>R en la EP se ha sugerido también al observarse que, al bloquear su activación en primates parkinsonianos intoxicados con MPTP disminuye significativamente la acción terapéutica de la L-DOPA; mientras que cuando la activación del D<sub>3</sub>R es bloqueada parcialmente no sólo se observan los beneficios de la L-DOPA en la función motora, sino que también disminuyen las discinecias asociadas con este tratamiento [135]. Lo cual sugiere que una regulación precisa del D<sub>3</sub>R es esencial para el funcionamiento del circuito estriatal. Esto adquiere mayor relevancia durante la pérdida progresiva y crónica de la DA. Se destaca además la posibilidad de dirigir el tratamiento de la EP hacia este receptor: el D<sub>3</sub>R.

En conclusión, la evidencia generada con nuestros experimentos muestra que la concentración de DA en el Nst influye de manera profunda en el estado funcional del D<sub>3</sub>R: cuando los niveles de DA se reducen significativamente se desarrolla una vía de señalización adicional asociada con este receptor, que depende de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> y cuyo blanco molecular son los canales de Ca<sup>2+</sup> Ca<sub>v</sub>2.1.

## 10. Métodos

### Lesión unilateral de la sustancia *nigra compacta*

El estudio se realizó siguiendo los lineamientos aprobados por el Comité de Bioética y Manejo de Animales de Experimentación de la UNAM, los cuales han sido aceptados por los Institutos Nacionales de Salud de los E.U.A. (NIH *approval number* A5281-01). La lesión unilateral de la vía nigroestriatal mediante la administración de 6-OHDA ha sido descrita previamente [171]. Brevemente, en ratas macho de la cepa Wistar (160-180g) anestesiadas con ketamina/xilacina se inyecta intracerebralmente 8 µg de 6-OHDA en solución (4 µg/µl, 0.5% de ácido ascórbico, 0.9% de NaCl). La solución de 6-OHDA es inyectada a una velocidad de 0.2 µl/min directamente en la sustancia negra compacta de acuerdo con las siguientes coordenadas estereotáxicas [172]: posterior (P)=4.80 mm de bregma, lateral (L)=1.6 mm a la izquierda de línea media, ventral (V)=8.2 mm debajo de la duramadre. En ratones se realizó un procedimiento similar para lesionar la SNc. Sin embargo, en estos se inyectó únicamente 0.5 µl de la solución de 6-OHDA (4 µg/µl). Las coordenadas fueron las siguientes: (P)=3.40 mm de bregma, lateral (L)=1.1 mm a la izquierda de línea media, ventral (V)=4.4 mm debajo de la duramadre. La eficiencia de la lesión se evalúa dos semanas después de la lesión mediante la prueba de giro en respuesta a la administración sistémica de amfetamina (4 mg/kg de peso, i.p.). Se seleccionaron los animales con más de 500 giros ipsilaterales en 90 min; en estos el nivel de DA ha disminuido ~ 95% [88].

### Genotipificación de los ratones BAC DrD1-eGFP

La genotipificación se realizó mediante un procedimiento estandarizado. Las colas de los ratones fueron cortadas e incubadas a 60 °C (3 h) en una solución tamponada de lisis: (50 mM KCl; 10 mM Tris HCl; 0.45% Nonidet P40; 0.45% Tween 20; pH 8.3) suplementada con 0.1 mg/ml proteinasa K. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA con fenol/cloroformo. El DNA se precipitó con etanol al 100% y se disolvió en solución Tris 10 mM. Usando el DNA como molde, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con pares de oligómeros para detectar la expresión de la eGFP y del promotor del D<sub>1</sub>R. En el caso de la eGFP los oligómeros fueron los siguientes: *forward*= 5' TGG TGA ACC GCA TCG AGC TGA AGG G 3'; *reverse*= 5' GAC CAT GTG ATC GCG CTT CTC GTT G 3'. Para el promotor del D<sub>1</sub>R: 5' GCG GCT CTT CTT CCT GGT ATG G 3'; *reverse*= 5' CTG AAG CAC TGC ACG CCG TAG 3'. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## Obtención de neuronas disociadas

Las ratas son anestesiadas profundamente y el cerebro es extraído y colocado en solución fisiológica (en mM: 126 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 11 glucosa, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico; pH=7.4, ajustado con HCl; 300±5 mOsm, ajustado con glucosa) a 4°C saturada con O<sub>2</sub> (95%) y CO<sub>2</sub> (5%). Inmediatamente se obtienen rebanadas sagitales de 300 µm con ayuda de un vibratomo (Campden) y se dejan en incubación a 37°C durante 30-60 min. Posteriormente la región dorsal del estriado es disecada e incubada por 20 min en una solución de pronasa XIV (Sigma) 1 mg/ml. Después de la digestión enzimática el tejido se disocia mecánicamente con pipetas Pasteur. Las células son sembradas en cajas de 35-mm Lux Petri que contienen solución de registro (en mM: 0.001 tetrodotoxina, 130 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucosa; pH=7.4, ajustado con NaOH; 300±5 mOsm/l, ajustado con glucosa).

## Registro electrofisiológico

La técnica de registro en célula completa sigue un procedimiento ya estandarizado en el laboratorio [108]. Los registros se realizan en neuronas de 10-12 µm de diámetro (capacitancia= 6-7 pF) con dendritas cortas (usualmente menores a 75 µm); el potencial de membrana se mantiene en -80 mV. Los registros son obtenidos con un amplificador Axopatch-200B (Axon Instruments, Foster City, CA) controlado y monitoreado con el programa de cómputo pClamp (versión 8), con una interfase DMA 125 kHz (Axon Instruments). La resistencia del electrodo fue de 3-6 MΩ mientras contenía la siguiente solución: (mM) 180 N-metil-D-glucamina, 40 HEPES, 10 EGTA, 4 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 0.4 GTP, 0.1 leupeptina; pH=7.2/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 280±5 mOsm/l).

Se obtuvieron registros de corrientes de Ba<sup>2+</sup> (bloqueador de canales de K<sup>+</sup>) mientras los canales de Na<sup>+</sup> eran bloqueados por tetrodotoxina (1 µM). Las relaciones corriente-voltaje (curva I-V) se obtuvieron antes y después de la aplicación de cada fármaco mediante dos diferentes comandos de voltaje: 1) comandos de pasos de 20 ms de duración de -80 a 50 mV en incrementos de 10 mV (intervalo entre cada estímulo= 2 s), y 2) comandos de rampa (0.7 mV/ms) de -80 a 50 mV (intervalo entre cada estímulo= 5 s). Para la aplicación de los fármacos se coloca un capilar aproximadamente a 100 µm de la célula en registro. El sistema es alimentado por la fuerza de gravedad y el cambio de soluciones se realiza mediante el control de las válvulas (Lee).

## Análisis de los datos

El ajuste de las curvas concentración-respuesta (gráficas C-R) se realizó de dos maneras. Primero, los datos fueron ajustados de acuerdo con la ecuación de Hill:

$$E = (E_{MAX} / (1 + \frac{IC_{50}^n}{[L]})) \quad (1)$$

donde: E= efecto del agonista o ligando (L) sobre la corriente de  $Ca^{2+}$  (en este caso disminución), graficado en el eje *y* una vez normalizado en % (media±ES),  $E_{MAX}$ = reducción máxima de la corriente de  $Ca^{2+}$ ,  $IC_{50}$ = concentración necesaria para obtener una reducción en la corriente de  $Ca^{2+}$  correspondiente al 50% del  $E_{MAX}$ , [L]= concentración de ligando (agonista) en mol/L, graficado en escala logarítmica en el eje *x*, y “n” es el coeficiente de Hill. En el caso de que  $n < 1$ , se evaluó si los datos eran mejor ajustados por una función de suma de ecuaciones de Hill, cada una con  $n = 1$ :

$$\sum_{i=1}^n E_{max}^i / (1 + \frac{IC_{50}^i}{[L]}) \quad (2)$$

El algoritmo del ajuste fue no-lineal (Marquardt) y se realizó con el programa de cómputo Origin 7 (Microcal, Northampton MA).

En general, se muestra la media±E.S. de la amplitud máxima de la corriente de  $Ca^{2+}$ . El análisis estadístico incluyó pruebas no-paramétricas: Prueba U de Mann-Whitney, prueba T de Wilcoxon (para muestras pareadas y no pareadas, respectivamente) y ANOVA con prueba de Tukey (*post hoc*).

## Inmunodetección tipo “Western”

Las ratas fueron anestesiadas profundamente y los cerebros removidos rápidamente y colocados en PBS a 4°C. El estriado dorsal fue disecado a partir de rebanadas sagitales de 300-400  $\mu$ m y homogenizado en sacarosa 320 mM suplementada con inhibidores de proteasas (Roche). El homogenado se centrifugó a 2000 g durante 5 min; el sobrenadante fue recuperado y sometido a centrifugación a 10000 g por 1 h. El precipitado fue disuelto en la misma solución y conservado a -70°C. El contenido proteico fue determinado mediante el ensayo de Bradford usando BSA en la elaboración de la curva patrón. Los extractos proteicos (40-60  $\mu$ g) fueron resueltos mediante SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). En la inmunodetección fueron usados los siguientes anticuerpos

primarios: anti-Cav2.1, anti-Cav2.2, anti-Cav1.2, anti-Cav1.3 (dilución 1:200; Alomone labs), anti-D<sub>3</sub>R (dilución 1:500; Calbiochem), anti-D<sub>3</sub>nf (1:200; Santa Cruz Biotechnology) y anti-ATPasa sodio/potasio alfa-1 (1:250; Affinity Bioreagents). Los complejos inmunes fueron revelados usando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Jackson Immuno-Research) y reactivos quimioluminiscentes (Amersham Biosciences). El análisis cuantitativo se realizó con el programa *Quantity One* (Biorad)

## 11. Bibliografía

- (1) DeLong M. R. In *Principles of neural science*; 4th ed.; E., K., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Eds.; McGraw-Hill: New York, 2000, p 853-867.
- (2) Graybiel A. M., Aosaki T., Flaherty A. W., Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* **1994**, *265*, 1826-31.
- (3) Wichmann T., DeLong M. R. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* **2003**, *991*, 199-213.
- (4) Grillner S., Hellgren J., Menard A., Saitoh K., Wikstrom M. A. Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* **2005**, *28*, 364-70.
- (5) Surmeier D. J., Ding J., Day M., Wang Z., Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* **2007**, *30*, 228-35.
- (6) Wilson C. J. In *The Synaptic Organization of the Brain*; Fifth ed.; Sheperd, G. M., Ed.; Oxford University Press: Oxford, 2004, p 361-414.
- (7) Albin R. L., Young A. B., Penney J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **1989**, *12*, 366-75.
- (8) Vautrelle N., Carrillo-Reid L.,argas J. In *Cortico-Subcortical dynamics in Parkinson's Disease*; Tseng, K.-Y., Ed.; Humana Press: New York, 2009, p 73-86.
- (9) Gerfen C. R., Engber T. M., Mahan L. C., Sussel Z., Chase T. N., Monsma F. J., Jr., Sibley D. R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **1990**, *250*, 1429-32.
- (10) Flores-Barrera E., Vizcarra-Chacon B. J., Tapia D.,argas J., Galarraga E. Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways *Frontiers in Systems Neuroscience* **2010**, *in press*.
- (11) Gertler T. S., Chan C. S., Surmeier D. J. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* **2008**, *28*, 10814-24.
- (12) Flores-Barrera E., Laville A., Plata V., Tapia D.,argas J., Galarraga E. Inhibitory contribution to suprathreshold corticostriatal responses: an experimental and modeling study. *Cell Mol Neurobiol* **2009**, *29*, 719-31.
- (13) Kreitzer A. C., Malenka R. C. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* **2008**, *60*, 543-54.
- (14) Girault J. A., Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* **2004**, *61*, 641-4.
- (15) Hernandez-Lopez S.,argas J., Surmeier D. J., Reyes A., Galarraga E. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci* **1997**, *17*, 3334-42.
- (16) Hernandez-Lopez S., Tkatch T., Perez-Garci E., Galarraga E.,argas J., Hamm H., Surmeier D. J. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[ $\beta$ 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* **2000**, *20*, 8987-95.

- (17) Perez-Garci E.,Bargas J.,Galarraga E. The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* **2003**, *14*, 1253-6.
- (18) Salgado H.,Tecuapetla F.,Perez-Rosello T.,Perez-Burgos A.,Perez-Garci E.,Galarraga E.,Bargas J. A reconfiguration of CaV2 Ca<sup>2+</sup> channel current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* **2005**, *94*, 3771-87.
- (19) Tepper J. M.,Koos T.,Wilson C. J. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* **2004**, *27*, 662-9.
- (20) Guzman J. N.,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* **2003**, *23*, 8931-40.
- (21) Tecuapetla F.,Carrillo-Reid L.,Bargas J.,Galarraga E. Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 10258-63.
- (22) Shen W.,Flajolet M.,Greengard P.,Surmeier D. J. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* **2008**, *321*, 848-51.
- (23) Missale C.,Nash S. R.,Robinson S. W.,Jaber M.,Caron M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **1998**, *78*, 189-225.
- (24) Vallone D.,Picetti R.,Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* **2000**, *24*, 125-32.
- (25) Yao W. D.,Spealman R. D.,Zhang J. Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochem Pharmacol* **2008**, *75*, 2055-69.
- (26) Richtand N. M. Behavioral sensitization, alternative splicing, and d3 dopamine receptor-mediated inhibitory function. *Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 2368-75.
- (27) Schmauss C.,Haroutunian V.,Davis K. L.,Davidson M. Selective loss of dopamine D3-type receptor mRNA expression in parietal and motor cortices of patients with chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 8942-6.
- (28) Liu K.,Bergson C.,Levenson R.,Schmauss C. On the origin of mRNA encoding the truncated dopamine D3-type receptor D3nf and detection of D3nf-like immunoreactivity in human brain. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 29220-6.
- (29) Sautel F.,Griffon N.,Levesque D.,Pilon C.,Schwartz J. C.,Sokoloff P. A functional test identifies dopamine agonists selective for D3 versus D2 receptors. *Neuroreport* **1995**, *6*, 329-32.
- (30) Waters N.,Svensson K.,Haadisma-Svensson S. R.,Smith M. W.,Carlsson A. The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* **1993**, *94*, 11-9.
- (31) Joyce J. N.,Millan M. J. Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today* **2005**, *10*, 917-25.
- (32) Kulagowski J. J.,Broughton H. B.,Curtis N. R.,Mawer I. M.,Ridgill M. P.,Baker R.,Emms F.,Freedman S. B.,Marwood R.,Patel S.,Ragan C. I.,Leeson P. D. 3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1H-pyrrolo-2,3-b-pyridine: an antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor. *J Med Chem* **1996**, *39*, 1941-2.
- (33) Patel S.,Marwood R.,Emms F.,Marston D.,Leeson P. D.,Curtis N. R.,Kulagowski J. J.,Freedman S. B. Identification and pharmacological characterization of

- [125I]L-750,667, a novel radioligand for the dopamine D4 receptor. *Mol Pharmacol* **1996**, *50*, 1658-64.
- (34) Sokoloff P.,Giros B.,Martres M. P.,Bouthenet M. L.,Schwartz J. C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **1990**, *347*, 146-51.
- (35) Coldwell M. C.,Boyfield I.,Brown A. M.,Stemp G.,Middlemiss D. N. Pharmacological characterization of extracellular acidification rate responses in human D2(long), D3 and D4.4 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* **1999**, *127*, 1135-44.
- (36) Newman-Tancredi A.,Audinot V.,Chaput C.,Verrielle L.,Millan M. J. [35S]Guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding as a measure of efficacy at human recombinant dopamine D4.4 receptors: actions of antiparkinsonian and antipsychotic agents. *J Pharmacol Exp Ther* **1997**, *282*, 181-91.
- (37) Stoof J. C.,Kebabian J. W. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature* **1981**, *294*, 366-8.
- (38) Flores-Hernandez J.,Cepeda C.,Hernandez-Echeagaray E.,Calvert C. R.,Jokel E. S.,Fienberg A. A.,Greengard P.,Levine M. S. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* **2002**, *88*, 3010-20.
- (39) Brami-Cherrier K.,Valjent E.,Garcia M.,Pages C.,Hipskind R. A.,Caboche J. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci* **2002**, *22*, 8911-21.
- (40) Yan Z.,Feng J.,Fienberg A. A.,Greengard P. D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 11607-12.
- (41) Beaulieu J. M.,Sotnikova T. D.,Marion S.,Lefkowitz R. J.,Gainetdinov R. R.,Caron M. G. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **2005**, *122*, 261-73.
- (42) Gould T. D.,Manji H. K. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology* **2005**, *30*, 1223-37.
- (43) Beaulieu J. M.,Sotnikova T. D.,Yao W. D.,Kockeritz L.,Woodgett J. R.,Gainetdinov R. R.,Caron M. G. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 5099-104.
- (44) Giros B.,Martres M. P.,Sokoloff P.,Schwartz J. C. [Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome]. *C R Acad Sci III* **1990**, *311*, 501-8.
- (45) Robinson S. W.,Jarvie K. R.,Caron M. G. High affinity agonist binding to the dopamine D3 receptor: chimeric receptors delineate a role for intracellular domains. *Mol Pharmacol* **1994**, *46*, 352-6.
- (46) Chio C. L.,Lajiness M. E.,Huff R. M. Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol* **1994**, *45*, 51-60.

- (47) Beom S.,Cheong D.,Torres G.,Caron M. G.,Kim K. M. Comparative studies of molecular mechanisms of dopamine D2 and D3 receptors for the activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 28304-14.
- (48) Diaz J.,Pilon C.,Le Foll B.,Gros C.,Triller A.,Schwartz J. C.,Sokoloff P. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* **2000**, *20*, 8677-84.
- (49) Levant B. The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. *Pharmacol Rev* **1997**, *49*, 231-52.
- (50) Araki K. Y.,Sims J. R.,Bhide P. G. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res* **2007**, *1156*, 31-45.
- (51) Stanwood G. D.,McElligot S.,Lu L.,McGonigle P. Ontogeny of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens of the rat. *Neurosci Lett* **1997**, *223*, 13-6.
- (52) Guillin O.,Diaz J.,Carroll P.,Griffon N.,Schwartz J. C.,Sokoloff P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* **2001**, *411*, 86-9.
- (53) Gurevich E. V.,Himes J. W.,Joyce J. N. Developmental regulation of expression of the D3 dopamine receptor in rat nucleus accumbens and islands of Calleja. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *289*, 587-98.
- (54) Catterall W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2000**, *16*, 521-55.
- (55) Budde T.,Meuth S.,Pape H. C. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* **2002**, *3*, 873-83.
- (56) Lipscombe D.,Helton T. D.,Xu W. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* **2004**, *92*, 2633-41.
- (57) Vergara R.,Rick C.,Hernandez-Lopez S.,Laville J. A.,Guzman J. N.,Galarraga E.,Surmeier D. J.,Bargas J. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* **2003**, *553*, 169-82.
- (58) Doering C. J.,Zamponi G. W. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **2003**, *35*, 491-505.
- (59) Tedford H. W.,Zamponi G. W. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 837-62.
- (60) Yan Z.,Surmeier D. J. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* **1996**, *16*, 2592-604.
- (61) Suh B. C.,Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* **2005**, *15*, 370-8.
- (62) Suh B. C.,Hille B. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* **2008**, *37*, 175-95.
- (63) Eyster K. M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* **2007**, *31*, 5-16.
- (64) Wu L.,Bauer C. S.,Zhen X. G.,Xie C.,Yang J. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P2. *Nature* **2002**, *419*, 947-52.

- (65) Perez-Burgos A.,Prieto G. A.,Galarraga E.,Bargas J. CaV2.1 channels are modulated by muscarinic M1 receptors through phosphoinositide hydrolysis in neostriatal neurons. *Neuroscience* **2010**, *165*, 293-9.
- (66) Lees A. J.,Hardy J.,Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* **2009**, *373*, 2055-66.
- (67) Hornykiewicz O. In *The history of neuroscience in autobiography*; Squire, L. R., Ed.; Elsevier, Academic press: San Diego, CA, 2004; Vol. 4, p 240-281.
- (68) Moore D. J.,West A. B.,Dawson V. L.,Dawson T. M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* **2005**, *28*, 57-87.
- (69) Thiruchelvam M.,Richfield E. K.,Baggs R. B.,Tank A. W.,Cory-Slechta D. A. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* **2000**, *20*, 9207-14.
- (70) Mercuri N. B.,Bernardi G. The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci* **2005**, *26*, 341-4.
- (71) Ding J.,Guzman J. N.,Tkatch T.,Chen S.,Goldberg J. A.,Ebert P. J.,Levitt P.,Wilson C. J.,Hamm H. E.,Surmeier D. J. RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* **2006**, *9*, 832-42.
- (72) Mendez I.,Vinuela A.,Astradsson A.,Mukhida K.,Hallett P.,Robertson H.,Tierney T.,Holness R.,Dagher A.,Trojanowski J. Q.,Isacson O. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* **2008**, *14*, 507-9.
- (73) Li J. Y.,Englund E.,Holton J. L.,Soulet D.,Hagell P.,Lees A. J.,Lashley T.,Quinn N. P.,Rehncrona S.,Bjorklund A.,Widner H.,Revesz T.,Lindvall O.,Brundin P. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* **2008**, *14*, 501-3.
- (74) Drucker-Colin R.,Verdugo-Diaz L. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cell Mol Neurobiol* **2004**, *24*, 301-16.
- (75) Kringelbach M. L.,Jenkinson N.,Owen S. L.,Aziz T. Z. Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 623-35.
- (76) Lee M. K.,Stirling W.,Xu Y.,Xu X.,Qui D.,Mandir A. S.,Dawson T. M.,Copeland N. G.,Jenkins N. A.,Price D. L. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 8968-73.
- (77) Kirik D.,Bjorklund A. Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. *Trends Neurosci* **2003**, *26*, 386-92.
- (78) Lo Bianco C.,Ridet J. L.,Schneider B. L.,Deglon N.,Aebischer P. alpha - Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 10813-8.
- (79) Perez F. A.,Palmiter R. D. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 2174-9.
- (80) Zhou Q. Y.,Palmiter R. D. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* **1995**, *83*, 1197-209.
- (81) Kim D. S.,Szczyepka M. S.,Palmiter R. D. Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. *J Neurosci* **2000**, *20*, 4405-13.

- (82) Chartoff E. H., Marck B. T., Matsumoto A. M., Dorsa D. M., Palmiter R. D. Induction of stereotypy in dopamine-deficient mice requires striatal D1 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 10451-6.
- (83) Perier C., Bove J., Vila M., Przedborski S. The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **2003**, 26, 345-6.
- (84) Ungerstedt U., Arbuthnott G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **1970**, 24, 485-93.
- (85) Simola N., Morelli M., Carta A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* **2007**, 11, 151-67.
- (86) Blandini F., Levandis G., Bazzini E., Nappi G., Armentero M. T. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* **2007**, 25, 397-405.
- (87) Schwarting R. K., Huston J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* **1996**, 50, 275-331.
- (88) Inaji M., Okauchi T., Ando K., Maeda J., Nagai Y., Yoshizaki T., Okano H., Nariai T., Ohno K., Obayashi S., Higuchi M., Suhara T. Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res* **2005**, 1064, 136-45.
- (89) Day M., Wang Z., Ding J., An X., Ingham C. A., Shering A. F., Wokosin D., Ilijic E., Sun Z., Sampson A. R., Mugnaini E., Deutch A. Y., Sesack S. R., Arbuthnott G. W., Surmeier D. J. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* **2006**, 9, 251-9.
- (90) Picconi B., Gardoni F., Centonze D., Mauceri D., Cenci M. A., Bernardi G., Calabresi P., Di Luca M. Abnormal Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J Neurosci* **2004**, 24, 5283-91.
- (91) Benson D. M., Blitzer R. D., Haroutunian V., Landau E. M. Functional muscarinic supersensitivity in denervated rat hippocampus. *Brain Res* **1989**, 478, 399-402.
- (92) Cangiano A. Denervation supersensitivity as a model for the neural control of muscle. *Neuroscience* **1985**, 14, 963-71.
- (93) Cai G., Wang H. Y., Friedman E. Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, 302, 1105-12.
- (94) Gerfen C. R., Miyachi S., Paletzki R., Brown P. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci* **2002**, 22, 5042-54.
- (95) Araki T., Tanji H., Kato H., Itoyama Y. Sequential changes of dopaminergic receptors in the rat brain after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle. *J Neurol Sci* **1998**, 160, 121-7.
- (96) Trugman J. M., James C. L. Rapid development of dopaminergic supersensitivity in reserpine-treated rats demonstrated with 14C-2-deoxyglucose autoradiography. *J Neurosci* **1992**, 12, 2875-9.

- (97) Ishida Y.,Kawai K.,Magata Y.,Takeda R.,Hashiguchi H.,Abe H.,Mukai T.,Saji H. Changes in dopamine D2 receptors and 6-[18F]fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine uptake in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurodegener Dis* **2004**, *1*, 109-12.
- (98) Da Cunha C.,Wietzikoski E. C.,Ferro M. M.,Martinez G. R.,Vital M. A.,Hipolide D.,Tufik S.,Canteras N. S. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behav Brain Res* **2008**, *189*, 364-72.
- (99) Creese I.,Burt D. R.,Snyder S. H. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* **1977**, *197*, 596-8.
- (100) Neve K. A.,Altar C. A.,Wong C. A.,Marshall J. F. Quantitative analysis of [3H]spiroperidol binding to rat forebrain sections: plasticity of neostriatal dopamine receptors after nigrostriatal injury. *Brain Res* **1984**, *302*, 9-18.
- (101) Breese G. R.,Knapp D. J.,Criswell H. E.,Moy S. S.,Papadeas S. T.,Blake B. L. The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Res Brain Res Rev* **2005**, *48*, 57-73.
- (102) Newman-Tancredi A.,Cussac D.,Brocco M.,Rivet J. M.,Chaput C.,Touzard M.,Pasteau V.,Millan M. J. Dopamine D2 receptor-mediated G-protein activation in rat striatum: functional autoradiography and influence of unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. *Brain Res* **2001**, *920*, 41-54.
- (103) Hayakawa T.,Chang M. C.,Rapoport S. I.,Appel N. M. Selective dopamine receptor stimulation differentially affects [3H]arachidonic acid incorporation, a surrogate marker for phospholipase A2-mediated neurotransmitter signal transduction, in a rodent model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *296*, 1074-84.
- (104) Cai G.,Zhen X.,Uryu K.,Friedman E. Activation of extracellular signal-regulated protein kinases is associated with a sensitized locomotor response to D(2) dopamine receptor stimulation in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* **2000**, *20*, 1849-57.
- (105) Zhen X.,Torres C.,Cai G.,Friedman E. Inhibition of protein tyrosine/mitogen-activated protein kinase phosphatase activity is associated with D2 dopamine receptor supersensitivity in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Pharmacol* **2002**, *62*, 1356-63.
- (106) de Rijk M. C.,Launer L. J.,Berger K.,Breteler M. M.,Dartigues J. F.,Baldereschi M.,Fratiglioni L.,Lobo A.,Martinez-Lage J.,Trenkwalder C.,Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* **2000**, *54*, S21-3.
- (107) INEGI Conteo de Población y vivienda, México. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/TabuladosBasicos> **2005**.
- (108) Bargas J.,Howe A.,Eberwine J.,Cao Y.,Surmeier D. J. Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* **1994**, *14*, 6667-86.
- (109) Martella G.,Spadoni F.,Sciamanna G.,Tassone A.,Bernardi G.,Pisani A.,Bonsi P. Age-related functional changes of high-voltage-activated calcium channels in different neuronal subtypes of mouse striatum. *Neuroscience* **2008**, *152*, 469-76.

- (110) Gackenheimer S. L., Schaus J. M., Gehlert D. R. [3H]-quinelorane binds to D2 and D3 dopamine receptors in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **1995**, *274*, 1558-65.
- (111) Chefer S. I., Kimes A. S., Matochik J. A., Horti A. G., Kurian V., Shumway D., Domino E. F., London E. D., Mukhin A. G. Estimation of D2-like receptor occupancy by dopamine in the putamen of hemiparkinsonian Monkeys. *Neuropsychopharmacology* **2008**, *33*, 270-8.
- (112) Qin Z. H., Chen J. F., Weiss B. Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxydopamine differentially alter the density, rate of synthesis, and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurochem* **1994**, *62*, 411-20.
- (113) Surmeier D. J., Song W. J., Yan Z. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* **1996**, *16*, 6579-91.
- (114) Heintz N. Gene expression nervous system atlas (GENSAT). *Nat Neurosci* **2004**, *7*, 483.
- (115) Nishi A., Snyder G. L., Greengard P. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* **1997**, *17*, 8147-55.
- (116) Oliveria S. F., Dell'Acqua M. L., Sather W. A. AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and nuclear signaling. *Neuron* **2007**, *55*, 261-75.
- (117) Bae Y. S., Lee T. G., Park J. C., Hur J. H., Kim Y., Heo K., Kwak J. Y., Suh P. G., Ryu S. H. Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol Pharmacol* **2003**, *63*, 1043-50.
- (118) Ahlgren-Beckendorf J. A., Levant B. Signaling mechanisms of the D3 dopamine receptor. *J Recept Signal Transduct Res* **2004**, *24*, 117-30.
- (119) Zhang L., Lou D., Jiao H., Zhang D., Wang X., Xia Y., Zhang J., Xu M. Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J Neurosci* **2004**, *24*, 3344-54.
- (120) Atkins C. M., Selcher J. C., Petraitis J. J., Trzaskos J. M., Sweatt J. D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1998**, *1*, 602-9.
- (121) Martin S. W., Butcher A. J., Berrow N. S., Richards M. W., Paddon R. E., Turner D. J., Dolphin A. C., Sihra T. S., Fitzgerald E. M. Phosphorylation sites on calcium channel alpha1 and beta subunits regulate ERK-dependent modulation of neuronal N-type calcium channels. *Cell Calcium* **2006**, *39*, 275-92.
- (122) Rousset M., Cens T., Gouin-Charnet A., Scamps F., Charnet P. Ca<sup>2+</sup> and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate stabilize a Gbeta gamma-sensitive state of Ca V2 Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 14619-30.
- (123) McLaughlin S., Murray D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **2005**, *438*, 605-11.
- (124) Olson P. A., Tkatch T., Hernandez-Lopez S., Ulrich S., Ilijic E., Mugnaini E., Zhang H., Bezprozvanny I., Surmeier D. J. G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* **2005**, *25*, 1050-62.

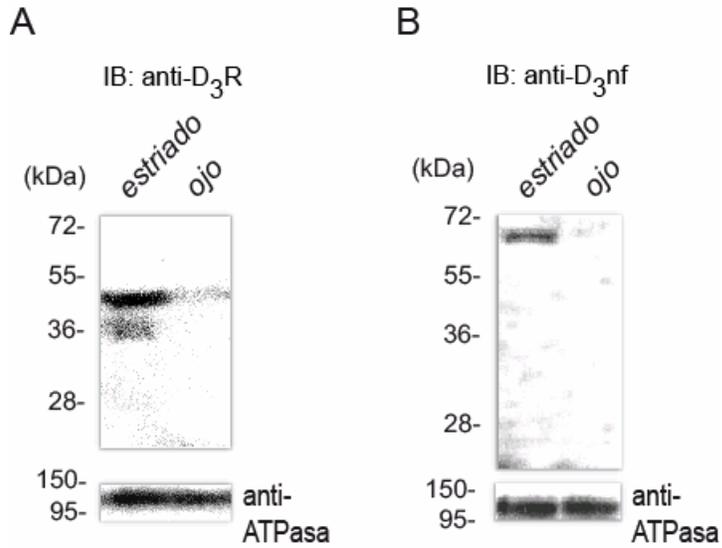
- (125) Elmhurst J. L., Xie Z., O'Dowd B. F., George S. R. The splice variant D3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization. *Brain Res Mol Brain Res* **2000**, *80*, 63-74.
- (126) Karpa K. D., Lin R., Kabbani N., Levenson R. The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol Pharmacol* **2000**, *58*, 677-83.
- (127) Fujieda H., Scher J., Lukita-Atmadja W., Brown G. M. Gene regulation of melatonin and dopamine receptors during eye development. *Neuroscience* **2003**, *120*, 301-7.
- (128) 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* **2002**, *15*, 815-25.
- (129) Sato K., Ueda H., Okumura F., Misu Y. 6-OHDA-induced lesion of the nigrostriatal dopaminergic neurons potentiates the inhibitory effect of 7-OHDPAT, a selective D3 agonist, on acetylcholine release during striatal microdialysis in conscious rats. *Brain Res* **1994**, *655*, 233-6.
- (130) Ridray S., Griffon N., Mignon V., Souil E., Carboni S., Diaz J., Schwartz J. C., Sokoloff P. Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci* **1998**, *10*, 1676-86.
- (131) Ishibashi T., Wakabayashi J., Ohno Y. 7-Hydroxy-N,N'-di-n-propyl-2-aminotetraline, a preferential dopamine D3 agonist, induces c-fos mRNA expression in the rat cerebellum. *Jpn J Pharmacol* **2002**, *89*, 309-15.
- (132) Levant B. Differential sensitivity of [3H]7-OH-DPAT-labeled binding sites in rat brain to inactivation by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline. *Brain Res* **1995**, *698*, 146-54.
- (133) Morissette M., Goulet M., Grondin R., Blanchet P., Bedard P. J., Di Paolo T., Levesque D. Associative and limbic regions of monkey striatum express high levels of dopamine D3 receptors: effects of MPTP and dopamine agonist replacement therapies. *Eur J Neurosci* **1998**, *10*, 2565-73.
- (134) Quik M., Police S., He L., Di Monte D. A., Langston J. W. Expression of D(3) receptor messenger RNA and binding sites in monkey striatum and substantia nigra after nigrostriatal degeneration: effect of levodopa treatment. *Neuroscience* **2000**, *98*, 263-73.
- (135) Bezard E., Ferry S., Mach U., Stark H., Leriche L., Boraud T., Gross C., Sokoloff P. Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* **2003**, *9*, 762-7.
- (136) St-Hilaire M., Landry E., Levesque D., Rouillard C. Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* **2005**, *20*, 450-60.
- (137) Hurley M. J., Stubbs C. M., Jenner P., Marsden C. D. D3 receptor expression within the basal ganglia is not affected by Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **1996**, *214*, 75-8.

- (138) Mercuri N. B., Saiardi A., Bonci A., Picetti R., Calabresi P., Bernardi G., Borrelli E. Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* **1997**, *79*, 323-7.
- (139) Stanwood G. D., Artymyshyn R. P., Kung M. P., Kung H. F., Lucki I., McGonigle P. Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [(125)I]7-OH-PIPAT: evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals. *J Pharmacol Exp Ther* **2000**, *295*, 1223-31.
- (140) Westrich L., Gil-Mast S., Kortagere S., Kuzhikandathil E. V. Development of tolerance in D3 dopamine receptor signaling is accompanied by distinct changes in receptor conformation. *Biochem Pharmacol* **2010**, *79*, 897-907.
- (141) Bruins Slot L. A., Palmier C., Tardif S., Cussac D. Action of novel antipsychotics at human dopamine D3 receptors coupled to G protein and ERK1/2 activation. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 232-41.
- (142) Galandrin S., Oligny-Longpre G., Bouvier M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **2007**, *28*, 423-30.
- (143) Scheller D., Ullmer C., Berkels R., Gwarek M., Lubbert H. The in vitro receptor profile of rotigotine: a new agent for the treatment of Parkinson's disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2009**, *379*, 73-86.
- (144) Scarselli M., Novi F., Schallmach E., Lin R., Baragli A., Colzi A., Griffon N., Corsini G. U., Sokoloff P., Levenson R., Vogel Z., Maggio R. D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 30308-14.
- (145) Torvinen M., Marcellino D., Canals M., Agnati L. F., Lluís C., Franco R., Fuxe K. Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Mol Pharmacol* **2005**, *67*, 400-7.
- (146) Fiorentini C., Busi C., Gorruso E., Gotti C., Spano P., Missale C. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol* **2008**, *74*, 59-69.
- (147) Marcellino D., Ferre S., Casado V., Cortes A., Le Foll B., Mazzola C., Drago F., Saur O., Stark H., Soriano A., Barnes C., Goldberg S. R., Lluís C., Fuxe K., Franco R. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 26016-25.
- (148) Schmauss C. Enhanced cleavage of an atypical intron of dopamine D3-receptor pre-mRNA in chronic schizophrenia. *J Neurosci* **1996**, *16*, 7902-9.
- (149) Richtand N. M., Liu Y., Ahlbrand R., Sullivan J. R., Newman A. H., McNamara R. K. Dopaminergic regulation of dopamine D3 and D3nf receptor mRNA expression. *Synapse*, DOI 10.1002/syn.20770.
- (150) Griffon N., Pilon C., Sautel F., Schwartz J. C., Sokoloff P. Two intracellular signaling pathways for the dopamine D3 receptor: opposite and synergistic interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* **1997**, *68*, 1-9.
- (151) Everett P. B., Senogles S. E. D3 dopamine receptor activates phospholipase D through a pertussis toxin-insensitive pathway. *Neurosci Lett* **2004**, *371*, 34-9.
- (152) Pedrosa R., Gomes P., Hopfer U., Jose P. A., Soares-da-Silva P. Gialpha3 protein-coupled dopamine D3 receptor-mediated inhibition of renal NHE3 activity in

- SHR proximal tubular cells is a PLC-PKC-mediated event. *Am J Physiol Renal Physiol* **2004**, *287*, F1059-66.
- (153) Beaulieu J. M.,Tirota E.,Sotnikova T. D.,Masri B.,Salahpour A.,Gainetdinov R. R.,Borrelli E.,Caron M. G. Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. *J Neurosci* **2007**, *27*, 881-5.
- (154) Azdad K.,Chavez M.,Don Bishop P.,Wetzelaer P.,Marescau B.,De Deyn P. P.,Gall D.,Schiffmann S. N. Homeostatic plasticity of striatal neurons intrinsic excitability following dopamine depletion. *PLoS One* **2009**, *4*, e6908.
- (155) Liang L.,DeLong M. R.,Papa S. M. Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* **2008**, *28*, 7537-47.
- (156) Taverna S.,Ilijic E.,Surmeier D. J. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* **2008**, *28*, 5504-12.
- (157) Bordet R.,Ridray S.,Carboni S.,Diaz J.,Sokoloff P.,Schwartz J. C. Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 3363-7.
- (158) Bordet R.,Ridray S.,Schwartz J. C.,Sokoloff P. Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Neurosci* **2000**, *12*, 2117-23.
- (159) Monville C.,Torres E. M.,Dunnett S. B. Validation of the l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists. *Brain Res Bull* **2005**, *68*, 16-23.
- (160) Vilchis C.,Bargas J.,Ayala G. X.,Galvan E.,Galarraga E. Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* **2000**, *95*, 745-52.
- (161) Galarraga E.,Bargas J.,Martinez-Fong D.,Aceves J. Spontaneous synaptic potentials in dopamine-denervated neostriatal neurons. *Neurosci Lett* **1987**, *81*, 351-5.
- (162) Finkelstein D. I.,Stanic D.,Parish C. L.,Tomas D.,Dickson K.,Horne M. K. Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* **2000**, *97*, 99-112.
- (163) Van Kampen J. M.,Eckman C. B. Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* **2006**, *26*, 7272-80.
- (164) Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* **2007**, *30*, 259-88.
- (165) Freedman S. B.,Patel S.,Marwood R.,Emms F.,Seabrook G. R.,Knowles M. R.,McAllister G. Expression and pharmacological characterization of the human D3 dopamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, *268*, 417-26.
- (166) Kuzhikandathil E. V.,Oxford G. S. Activation of human D3 dopamine receptor inhibits P/Q-type calcium channels and secretory activity in AtT-20 cells. *J Neurosci* **1999**, *19*, 1698-707.
- (167) Pritchard L. M.,Newman A. H.,McNamara R. K.,Logue A. D.,Taylor B.,Welge J. A.,Xu M.,Zhang J.,Richtand N. M. The dopamine D3 receptor antagonist NGB

- 2904 increases spontaneous and amphetamine-stimulated locomotion. *Pharmacol Biochem Behav* **2007**, *86*, 718-26.
- (168) De Boer P., Enrico P., Wright J., Wise L. D., Timmerman W., Moor E., Dijkstra D., Wikstrom H. V., Westerink B. H. Characterization of the effect of dopamine D3 receptor stimulation on locomotion and striatal dopamine levels. *Brain Res* **1997**, *758*, 83-91.
- (169) Pritchard L. M., Logue A. D., Hayes S., Welge J. A., Xu M., Zhang J., Berger S. P., Richtand N. M. 7-OH-DPAT and PD 128907 selectively activate the D3 dopamine receptor in a novel environment. *Neuropsychopharmacology* **2003**, *28*, 100-7.
- (170) Mori T., Murase K., Tanaka J., Ichimaru Y. Biphasic effects of D3-receptor agonists, 7-OH-DPAT and PD128907, on the D1-receptor agonist-induced hyperactivity in mice. *Jpn J Pharmacol* **1997**, *73*, 251-4.
- (171) Dunnett S. B., Bjorklund A., Stenevi U., Iversen S. D. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res* **1981**, *215*, 147-61.
- (172) Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*; 3rd ed.; Academic Press: San Diego, CA, 1996.

## 12. Apéndice



Extractos proteicos (40-50  $\mu$ g) de membrana del estriado dorsal y ojo fueron resueltos por SDS-PAGE 12%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y probados con anticuerpos anti-D<sub>3</sub>R (**A**) y anti-D<sub>3</sub>nf (**B**). Note la ausencia de señal en el carril correspondiente al ojo. La detección realizada con un anticuerpo anti-ATPasa (~110 kDa) se usó como control de carga.

## RAPID REPORTS

DOPAMINE D<sub>2</sub>-CLASS RECEPTOR SUPERSENSITIVITY AS REFLECTED IN Ca<sup>2+</sup> CURRENT MODULATION IN NEOSTRIATAL NEURONS

G. A. PRIETO, A. PEREZ-BURGOS, T. FIORELISIO, H. SALGADO, E. GALARRAGA, R. DRUCKER-COLIN AND J. BARGAS\*

*Instituto de Fisiología Celular-Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México*

**Abstract**—The loss of dopaminergic neurons followed by dopamine (DA) depletion in the neostriatum is a hallmark of Parkinson's disease. Among other changes, DA D<sub>2</sub>-receptor class (D<sub>2</sub>R-class) supersensitivity is a result of striatal DA depletion. Pharmacological, biochemical and behavioral data have documented this phenomenon, but clear electrophysiological-functional correlates are still lacking. This work describes an electrophysiological correlate of D<sub>2</sub>R-class supersensitivity in DA-depleted striata after unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions in the rat substantia nigra compacta (SNc). Ca<sup>2+</sup> current modulation mediated by D<sub>2</sub>R-class activation reflected an altered sensitivity. Thus, while the concentration–response relationship (C–R plot) from control striata was better fit with a two sites model, the C–R plot obtained from DA-depleted striata was better fit by a three sites model, exhibited a considerable leftward shift, and presented an increased maximal response. Because Ca<sup>2+</sup> current modulation by D<sub>2</sub>R-class activation is involved in the control of spiny neurons excitability and their synaptic GABA release, the present findings may help to explain several functional changes found in the striatal circuitry after dopaminergic denervation. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** receptor supersensitivity, dopamine receptor, Ca<sup>2+</sup> channels, Parkinson's disease, 6-OHDA, concentration–response plot.

An accepted experimental model of striatal dopamine (DA) depletion uses 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to unilaterally destroy dopaminergic neurons in the substantia nigra compacta (SNc) (Blandini et al., 2007). Dopaminergic receptor supersensitivity follows DA depletion: D<sub>2</sub>-receptor class (D<sub>2</sub>R-class) supersensitivity has been correlated with enhancement of turning behavior, increased receptor expression, and increases in the

coupling and stimulation of G-proteins and associated signaling (Creese et al., 1977; Arnt and Hyttel, 1985; Gerfen et al., 1990; Qin et al., 1994; Schwarting and Huston, 1996; Cai et al., 2000, 2002; Hayakawa et al., 2001; Newman-Tancredi et al., 2001; Inaji et al., 2005). However, no physiological function directly related with neuronal excitability has been correlated with D<sub>2</sub>R-class supersensitivity. Ca<sup>2+</sup> current modulation by D<sub>2</sub>R-class (Olson et al., 2005; Salgado et al., 2005) controls excitability (Hernandez-Lopez et al., 2000) and synaptic GABA release (Guzman et al., 2003). Therefore, we investigated whether D<sub>2</sub>R-class supersensitivity can be detected as an altered Ca<sup>2+</sup> current modulation in neostriatal neurons.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

Studies were approved by the UNAM Committee of Bioethics and followed the National Institutes of Health Guidelines (NIH Publications No. 8023, revised 1996). DA depletion after 6-OHDA has been described (Dunnett et al., 1981). Briefly, male Wistar rats (180–200 g) were injected stereotaxically with 4 μg of 6-OHDA (Sigma, St. Louis, MO, USA) into the left substantia nigra (SN: 4.80 mm caudal, 1.6 mm lateral to bregma, and 8.2 mm ventral to the skull surface). 6-OHDA solution (4 μg/μl saline with 0.2 mg/ml of ascorbic acid) was ejected at a rate of 0.1 μl/min. After 2 weeks animals were selected based on their rotational behavior (amphetamine: 4 mg/kg i.p.; >500 ipsilateral stereotyped turns) (Inaji et al., 2005). The number of animals used in the experimental samples was the minimal possible to attain statistical significance. All procedures employed anaesthesia to avoid animal suffering.

Neurons were obtained as previously described (Bargas et al., 1994; Perez-Burgos et al., 2008): the dorsal neostriatum was dissected from 300 μm thick brain slices incubated with 1 mg/ml of pronase E type XIV (Sigma) at 34 °C. After 20 min, cells were dissociated using a graded series of fire polished Pasteur pipettes (Corning Inc., NY, USA). Cell suspension was plated into a petri dish containing saline (in mM): 0.001 tetrodotoxin (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel), 130 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucose (pH=7.4 with NaOH; 300±5 mosM/l with glucose).

Voltage-clamp recordings were performed on medium-sized neostriatal neurons (10–12 μm main diameter; whole-cell capacitance 6–7 pF) (Yan and Surmeier, 1996). Internal saline contained (in mM): 180 N-methyl-D-glucamine, 40 HEPES, 10 EGTA, 4 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 0.4 GTP and 0.1 leupeptin (pH=7.2 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 280±5 mOsM/l). Whole-cell recordings were obtained with an Axopatch-200 B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and monitored with pCLAMP (v8) and a 125 kHz DMA interface (Axon Ins.). Series resistance (<10 MΩ) was compen-

\*Corresponding author. Tel: +5255-5622-5670; fax: +5255-5622-5607. E-mail address: jbargas@ifc.unam.mx (J. Bargas).

**Abbreviations:** C–R plots, concentration–response relationships; D<sub>2</sub>R-class, D<sub>2</sub>-receptor class; DA, dopamine; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; I–V plots, current–voltage relationships; ω-CgTx, ω-conotoxin GVIA; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine.

sated (70–80%). Ba<sup>2+</sup> (5 mM) currents were recorded while blocking Na<sup>+</sup>-channels (1 μM tetrodotoxin). Current–voltage relationships (I–V plots) were built before and after drug applications. Nitrendipine, quinelorane (Sigma Aldrich-RBI, St. Louis, MO, USA), ω-conotoxin GVIA (ω-CgTx) (Alomone Laboratories), ω-agatoxin TK (Peptides International, Louisville, KY, USA) and CdCl<sub>2</sub> were applied with a gravity-fed system. Concentration–response relationships (C–R plots) were fitted to the Hill equation:

$$E = \left( E_{\text{MAX}} \left( 1 + \frac{IC_{50}}{[L]} \right)^n \right) \quad (1)$$

(E=effect of ligand (L), E<sub>MAX</sub>=maximal reduction of Ca<sup>2+</sup> current, IC<sub>50</sub>=concentration necessary to obtain a Ca<sup>2+</sup> current reduction=0.5E<sub>MAX</sub>, and “n” is the Hill coefficient). When n≠1 we fitted the data with a sum of Hill equations with n=1 each:

$$\sum_{i=1}^n E_{\text{max}i} \left( 1 + \frac{IC_{50i}}{[L]} \right) \quad (2)$$

(Marquardt algorithm; origin 7, Microcal, Northampton, MA, USA.) Mean±standard error of the mean (SEM) of peak Ca<sup>2+</sup> currents are reported. One-way analysis of variance (ANOVA) and t-tests were used to assess significance.

For immunoblotting, dorsal striata were dissected from brain slices and homogenized in 320 mM sucrose containing protease inhibitors. Homogenate was centrifuged at 2000×g for 5 min; supernatant was recovered and centrifuged at 10000×g for 1 h. Pellet was resuspended in the same solution and stored at –70 °C. Protein extracts (40–60 μg) were submitted to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and resolved proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Blots were immunostained with the following antibodies: anti-Ca<sub>v</sub>2.1, anti-Ca<sub>v</sub>2.2, anti-Ca<sub>v</sub>1.2, anti-Ca<sub>v</sub>1.3 (1:200 dilution; Alomone Labs) and anti-sodium/potassium ATPase alpha-1 (1:250 dilution; Affinity BioReagents, Rockford, IL, USA). Immune complexes were revealed by using appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA) along with a chemiluminescent reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Densitometric analysis was carried out by using the quantity one software (Bio-Rad).

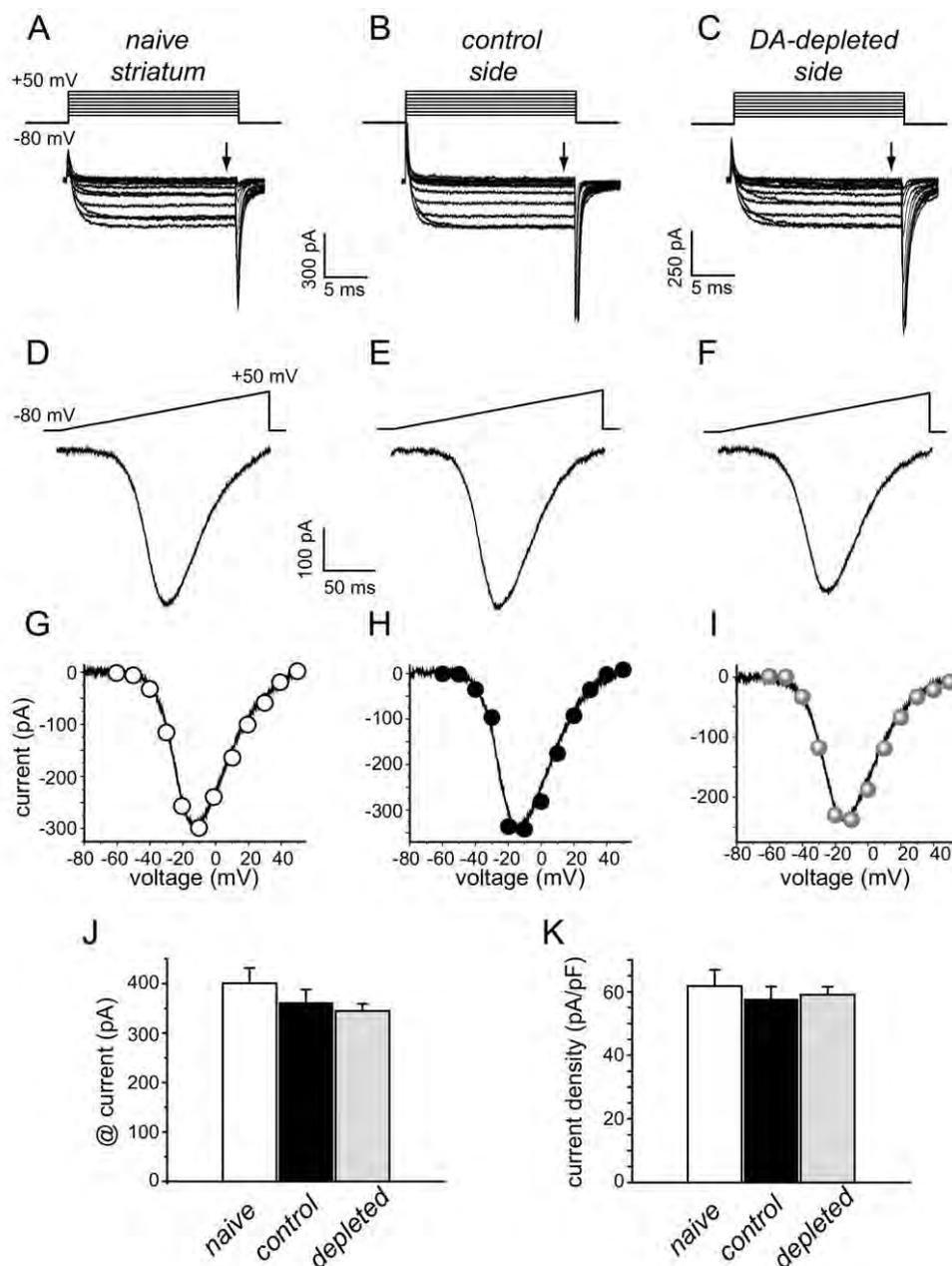
## RESULTS

To observe whether Ca<sup>2+</sup> currents were changed after DA depletion, we recorded neurons from non-injured (naïve), contralateral (control side) and ipsilateral DA-depleted (DA-depleted side) striata of 6-OHDA-lesioned animals (Fig. 1). Fig. 1A–C show families of currents evoked with depolarizing voltage commands from –80 to +50 mV in 10 mV increments (on top). Fig. 1D–F illustrate currents evoked by ramp commands between the same voltages (top: 180 ms; 0.7 mV/ms) (e.g., Perez-Burgos et al., 2008). I–V plots resulting from both steps and ramp protocols were superimposable (Fig. 1G–I; symbols, from step commands; lines, from ramp commands). For clarity, next figures will only illustrate ramp-obtained I–V plots. Average Ca<sup>2+</sup> current amplitudes were 400±31 pA (n=46), 362±27 pA (n=48) and 345±14 pA (n=164) in neurons from naïve, control and DA-depleted striata, respectively (Fig. 1J; NS). Current density (current/whole cell capacitance) showed no significant differences (Fig. 1K), indicating that Ca<sup>2+</sup> channels numbers do not change after DA depletion.

But neostriatal neurons express several classes of Ca<sup>2+</sup> channels (Ca<sub>v</sub>1.2, 3 L<sub>C,D</sub>, Ca<sub>v</sub>2.1–3–N, P/Q, R)

(Bargas et al., 1994; Salgado et al., 2005; Martella et al., 2008). Therefore, we also evaluated whether their relative proportions change as a result of DA depletion. Fig. 2 shows I–V plots from two neurons exposed to three selective channel blockers in sequence: 10 μM nitrendipine to block L-type (Ca<sub>v</sub>1) Ca<sup>2+</sup>-channels, 400 nM ω-agatoxin-TK to block P/Q-type (Ca<sub>v</sub>2.1) Ca<sup>2+</sup>-channels, 1 μM ω-CgTx to block N-type (Ca<sub>v</sub>2.2) Ca<sup>2+</sup>-channels, and finally 100 μM Cd<sup>2+</sup> to block Ca<sup>2+</sup>-channels which are left (mostly Ca<sub>v</sub>2.3 or R-channels) (Bargas et al., 1994). The same drug application sequence was administered in samples of neurons obtained from both ipsi- and contra-lateral striata of 6-OHDA-lesioned animals. Percentages of blockage obtained for the control side (Fig. 2A) were 31±6%, 32±6%, 8±1%, and 18±5% after nitrendipine, ω-agatoxin-TK, ω-conotoxin GVIA, and Cd<sup>2+</sup>, respectively (n=7). While the corresponding percentages for the DA-depleted striatum were (Fig. 2B): 33±6%, 27±5%, 12±3%, and 19±5%, respectively (n=8). No significant (NS) differences were found (Fig. 2C). However, because this comparison was based on small samples of neurons commonly exhibiting some variability, as compared to larger samples in previous studies (Salgado et al., 2005; Martella et al., 2008), we also estimated the expression of L, N and P/Q types Ca<sup>2+</sup>-channels by Western blot analysis from dissected naïve, control and DA-depleted dorsal striata (Fig. 2D). Basically, this analysis confirmed the electrophysiological measurements: DA depletion induced by 6-OHDA lesion of the SNc does not change the relative expression of Ca<sup>2+</sup> channels present in medium-sized neostriatal neurons.

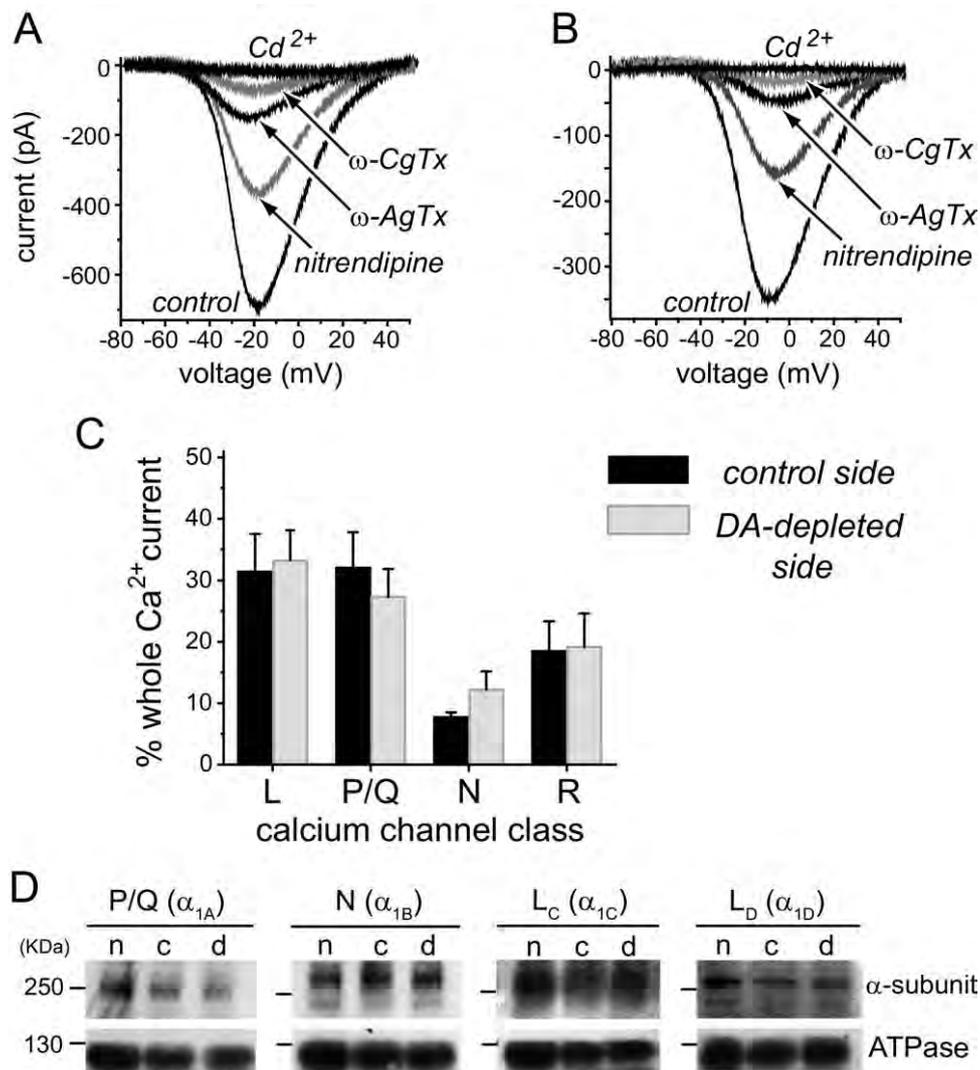
To examine Ca<sup>2+</sup> current modulation by D<sub>2</sub>R-class in DA-depleted striata we used quinelorane, a selective D<sub>2</sub>R-class agonist (Gackenheim et al., 1995; Coldwell et al., 1999). As expected, not all neurons were sensitive to quinelorane: D<sub>2</sub>R-class-mediated inhibition of Ca<sup>2+</sup> current was observed in approximately 70% of the neurons from naïve, control and DA-depleted striata. This percentage is similar to the proportion of striatal neurons expressing D<sub>2</sub>R-type plus those co-expressing D<sub>2</sub> and D<sub>1</sub>R-type. In addition a few neurons may express the D<sub>3</sub> or D<sub>4</sub>R-types (Surmeier et al., 1996). It was observed that 100 nM quinelorane, a concentration that hardly affected Ca<sup>2+</sup> currents in any neuron obtained from naïve/control striata (Fig. 3A, B), readily reduced Ca<sup>2+</sup> currents in neurons obtained from DA-depleted striata (Fig. 3C). C–R plots were built for D<sub>2</sub>R-class responsive neurons from naïve (Fig. 3D empty circles; n=36) and control side striata (Fig. 3D filled squares; n=14). C–R plots were best fitted with a two sites model (black line; Hill coefficient (mean±estimation error)=0.57±0.12, r<sup>2</sup>=0.98) with IC<sub>50</sub>s of 493±90 nM and 40±17 μM (gray lines; see Experimental Procedures). There were no significant differences between control side and naïve striata (results were pooled together). In contrast, the C–R plot built with neurons obtained from DA-depleted striata exhibited a considerable leftward shift (Fig. 3E gray circles; n=32) and was best fitted with a three sites model (black line; Hill coefficient=0.32±0.04, r<sup>2</sup>=0.99) with IC<sub>50</sub>s of 0.8±0.1 nM,



**Fig. 1.**  $\text{Ca}^{2+}$  current density is not altered in medium-sized neostriatal neurons after DA depletion. (A, B, C) Representative families of currents evoked by 20 ms voltage commands (top) from  $-80$  to  $50$  mV, in  $10$  mV steps, in neurons dissociated from (A) naive, (B) control and (C) DA-depleted striata. Arrows indicate the times where measurements were taken. (D, E, F) Representative current evoked with a depolarizing ramp command from  $-80$  to  $50$  mV (top:  $180$  ms;  $0.7$  mV/ms) in the same neurons. (G, H, I) Current–voltage relationships (I–V plots) built with corresponding measurements in (A, B, C) (symbols) and (D, E, F) (continuous lines). Superimposition shows a match in all three cases. (J) Histogram comparing  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude (mean  $\pm$  SEM) in samples of neurons ( $n > 40$ ) recorded in each condition. (K) Current divided by cell capacitance in each neuronal sample shows no significant change in current density.

$90 \pm 17$  nM, and  $9.8 \pm 1.5$   $\mu\text{M}$  (gray lines) ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.001$  comparing the two right sites and  $P < 0.0001$  comparing the Hill coefficients; Student's  $t$ -tests; see Experimental Procedures). The results show that  $\text{D}_2\text{R}$ -class modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  current is altered after DA depletion suggesting that it reflects  $\text{D}_2\text{R}$ -class supersensitivity: (1) the leftward shift in the C–R plot and lower  $\text{IC}_{50}\text{s}$  correlated with the described increase in receptor affinity (Chefer et al., 2008), (2) an ad-

ditional very sensitive site of action was unveiled (18% of modulation; Hill coefficients were significantly different, from  $\sim 0.6$  to  $\sim 0.3$ , using the best fits in each case; see Experimental Procedures), and (3) the maximal reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $E_{\text{max}}$ ) was enhanced:  $70 \pm 3\%$  ( $n = 32$  DA-depleted) vs.  $57 \pm 4\%$  ( $n = 50$  control/naive;  $P < 0.005$ ), paralleling the reported increase in  $\text{D}_2\text{R}$  numbers (Creese et al., 1977; Qin et al., 1994; Cai et al., 2002).



**Fig. 2.** Relative expression of Ca<sup>2+</sup> channel types is not altered by DA depletion in medium-sized neostriatal neurons. (A, B) Specific Ca<sup>2+</sup> channel antagonists were administered in sequence: 10 μM nitrendipine to block L-type (Ca<sub>v</sub>1) Ca<sup>2+</sup>-channels, 400 nM ω-agatoxin-TK (ω-AgTx) to block P/Q-type (Ca<sub>v</sub>2.1) Ca<sup>2+</sup>-channels, 1 μM ω-CgTx to block N-type (Ca<sub>v</sub>2.2) Ca<sup>2+</sup>-channels, and finally 100 μM Cd<sup>2+</sup> to block Ca<sup>2+</sup>-channels which are left (mostly Ca<sub>v</sub>2.3 or R-channels) on a sample of neurons from (A) control (n=7) and (B) DA-depleted (n=8) striata. (C) There were no significant differences in the percentages of block between the two samples. (D) This result is supported by Western blots comparing the expression of α-subunits of Ca<sup>2+</sup> channels in cell lysates obtained from naive, control and DA-depleted striata (n, c and d, respectively). Signal from ATPase (~110 kDa) was used as a loading control.

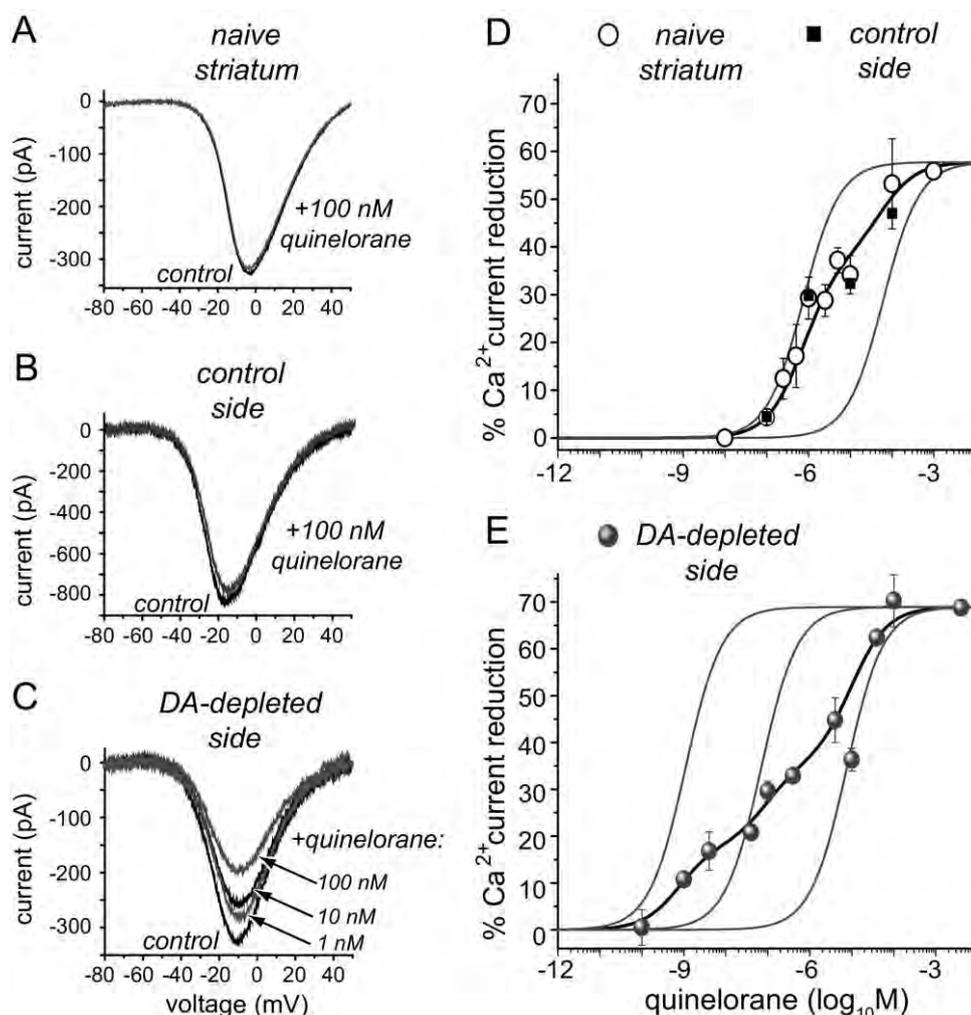
**DISCUSSION**

It is demonstrated that Ca<sup>2+</sup> current modulation by D<sub>2</sub>R-class activation reflects D<sub>2</sub>R-class supersensitivity, indicating that this phenomenon is capable to disrupt intrinsic mechanisms of neostriatal neurons. Similar findings have been reported for globus pallidus neurons by using quinpirole (Stefani et al., 2002).

We showed that Ca<sup>2+</sup> current density and relative contributions of Ca<sup>2+</sup>-channel types do not change in neostriatal neurons after DA depletion. As in previous studies, these comparisons did not assume differences among striatal neurons. Therefore, they rule out adaptive changes in the molecular effectors (Ca<sup>2+</sup>-channels) themselves. C–R plots built by measuring a function normally regulated

by DA: Ca<sup>2+</sup> current modulation in D<sub>2</sub>R-class responsive neurons, did exhibit changes compatible with supersensitivity: First, a leftward shift of the whole C–R plot after DA depletion demonstrated an increased sensitivity. Secondly, an additional nanomolar sensitive site was unveiled (Seeman et al., 2005) after a significantly different Hill coefficient value. Finally, an increased maximal response was also detected. Therefore, Ca<sup>2+</sup> current modulation reveals a functional correlate of D<sub>2</sub>R-class supersensitivity. Because relative contributions of Ca<sup>2+</sup>-channel types were not modified after DA depletion, the differences encountered can be attributed to DA receptor-signaling alterations.

At present, the identity of the different sites of action found is not known. Single neostriatal neurons express



**Fig. 3.** Concentration–response relationships for quinolorane. (A, B, C) Representative I–V plots before (black) and during 100 nM quinolorane (gray) in neurons from (A) naive, (B) control-side and (C) DA-depleted striata. Note that 100 nM quinolorane only affects neurons obtained from DA-depleted striata, which are also affected by smaller quinolorane concentrations. (D) C–R plots for neurons obtained from naive (empty circles) and control side (filled squares) striata. Black trace is the best fit for two action sites, each one represented by the gray lines:  $IC_{50}$ s: 493 nM and 40  $\mu$ M ( $r^2=0.98$ ; neurons from naive and control side striata were pooled together since there were no significant differences; see Experimental Procedures). (E) The C–R plot obtained from neurons of DA-depleted striata was shifted to the left (symbols) and better fitted with three sites, each one represented by the gray lines:  $IC_{50}$ s: 0.8 nM, 90 nM and 9.8  $\mu$ M ( $r^2=0.99$ ).  $P<0.0001$  and  $P<0.001$  comparing the two sites in naïve/control striata with the two sites at the right in the C–R plot from DA-depleted striata, respectively. Maximal reduction of  $Ca^{2+}$  current ( $E_{max}$ ) obtained from control/naïve striata ( $57\pm4\%$ ) was significantly enhanced in neurons obtained from DA-depleted striata ( $70\pm3\%$ ;  $P<0.005$ ).

various types ( $D_2R$ ,  $D_3R$ , and  $D_4R$ ) of the  $D_2R$ -class (Surmeier et al., 1996). Therefore, a working hypothesis would be that one of these types is particularly involved in the boosted modulation. Given that the affinity reported for quinolorane on  $D_3R$ -type is about  $\approx 1$  nM (Gackenheim et al., 1995; Coldwell et al., 1999), it is suggested that the novel site ( $IC_{50}=0.8$  nM) disclosed after DA depletion could be related to  $D_3R$ -type. Preliminary data (unpublished results) using selective antagonists for  $D_2R$ -,  $D_3R$ - and  $D_4R$ -types are in line with this idea. Alternatively, different  $D_2R$ -type affinities resulting from crosstalk or dimerization of some receptors may explain the data.

$Ca^{2+}$  currents are essential for adjusting patterning, excitability and synaptic transmission in neostriatal neu-

rons and circuitry (Hernandez-Lopez et al., 1997, 2000; Perez-Garci et al., 2003; Vergara et al., 2003; Guzman et al., 2003; Salgado et al., 2005). The present results suggest a cause of possibly changes found in these variables after DA depletion.

*Acknowledgments*—We thank Antonio Laville and Marcela Palomero-Rivero for technical support and advice. This work was supported by a grant from IMPULSA-UNAM 03, and DGAPA-UNAM grants numbers: IN-201603 to José Bargas, IN-201507 to Elvira Galarraga and CONACyT-Mexico grant 49484 to José Bargas. G.A. Prieto, A Perez-Burgos and Humberto Salgado had CONACyT (Mexico) fellowships. G.A. Prieto also had a fellowship from the Fundación Alberto y Dolores Andrade; A Perez-Burgos also had a fellowship from IMPULSA-UNAM.

## REFERENCES

- Arnt J, Hyttel J (1985) Differential involvement of dopamine D-1 and D-2 receptors in the circling behaviour induced by apomorphine, SK and F 38393, pergolide and LY 171555 in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Psychopharmacology* 85:346–352.
- Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of  $Ca^{2+}$  currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667–6686.
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT (2007) Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 25:397–405.
- Cai G, Wang HY, Friedman E (2002) Increased dopamine receptor signaling and dopamine receptor-G protein coupling in denervated striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1105–1112.
- Cai G, Zhen X, Uryu K, Friedman E (2000) Activation of extracellular signal-regulated protein kinases is associated with a sensitized locomotor response to  $D_2$  dopamine receptor stimulation in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 20:1849–1857.
- Chefer SI, Kimes AS, Matochik JA, Horti AG, Kurian V, Shumway D, Domino EF, London ED, Mukhin AG (2008) Estimation of  $D_2$ -like receptor occupancy by dopamine in the putamen of hemiparkinsonian monkeys. *Neuropsychopharmacology* 33:270–278.
- Coldwell MC, Boyfield I, Brown AM, Stemp G, Middlemiss DN (1999) Pharmacological characterization of extracellular acidification rate responses in human  $D_2$ (long),  $D_3$  and  $D_4$  receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 127:1135–1144.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH (1977) Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* 197:596–598.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Stenevi U, Iversen SD (1981) Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res* 215:147–161.
- Gackenhaimer SL, Schaus JM, Gehlert DR (1995) [ $^3H$ ]-quinelorane binds to  $D_2$  and  $D_3$  dopamine receptors in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 274:1558–1565.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR (1990)  $D_1$  and  $D_2$  dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–1432.
- Guzman JN, Hernandez A, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Vergara R, Aceves J, Bargas J (2003) Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci* 23:8931–8940.
- Hayakawa T, Chang MC, Rapoport SI, Appel NM (2001) Selective dopamine receptor stimulation differentially affects [ $^3H$ ]arachidonic acid incorporation, a surrogate marker for phospholipase  $A_2$ -mediated neurotransmitter signal transduction, in a rodent model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 296:1074–1084.
- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997)  $D_1$  receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000)  $D_2$  dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type  $Ca^{2+}$  currents and excitability via a novel PLC $\beta$ 1-IP $_3$ -calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987–8995.
- Inaji M, Okauchi T, Ando K, Maeda J, Nagai Y, Yoshizaki T, Okano H, Nariai T, Ohno K, Obayashi S, Higuchi M, Sahara T (2005) Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res* 1064:136–145.
- Martella G, Spadoni F, Sciamanna G, Tassone A, Bernardi G, Pisani A, Bonsi P (2008) Age-related functional changes of high-voltage-activated calcium channels in different neuronal subtypes of mouse striatum. *Neuroscience* 152:469–476.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Brocco M, Rivet JM, Chaput C, Touzard M, Pasteau V, Millan MJ (2001) Dopamine  $D_2$  receptor-mediated G-protein activation in rat striatum: functional autoradiography and influence of unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. *Brain Res* 920:41–54.
- Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal  $Ca_v1.3$  L-type  $Ca^{2+}$  channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25:1050–1062.
- Perez-Burgos A, Perez-Rosello T, Salgado H, Flores-Barrera E, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J (2008) Muscarinic  $M_1$  modulation of N and L types of calcium channels is mediated by PKC in neostriatal neurons. *Neuroscience* 155:1079–1097.
- Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of  $Ca^{2+}$  channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14:1253–1256.
- Qin ZH, Chen JF, Weiss B (1994) Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxydopamine differentially alter the density, rate of synthesis, and level of gene expression of  $D_1$  and  $D_2$  dopamine receptors. *J Neurochem* 62:411–420.
- Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J (2005) A reconfiguration of  $Ca_v2$   $Ca^{2+}$  channel current and its dopaminergic  $D_2$  modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94:3771–3787.
- Stefani A, Spadoni F, Martorana A, Lavaroni F, Martella G, Sancesario G, Bernardi G (2002)  $D_2$ -mediated modulation of N-type calcium currents in rat globus pallidus neurons following dopamine denervation. *Eur J Neurosci* 15:815–825.
- Schwartz RK, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50:275–331.
- Seeman P, Weinshenker D, Quirion R, Srivastava LK, Bhardwaj SK, Grandy DK, Premont RT, Sotnikova TD, Boksa P, El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR, Perreault ML, Mannisto PT, Robinson S, Palmiter RD, Tallerico T (2005) Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3513–3518.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579–6591.
- Vergara R, Rick C, Hernandez-Lopez S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J (2003) Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol* 553:169–182.
- Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic ( $m2/m4$ ) receptors reduce N- and P-type  $Ca^{2+}$  currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592–2604.