



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE LOS
RECEPTORES A DOPAMINA TIPO D1 Y D2 EN EL ESTRIADO
LESIONADO DE LA RATA ALBINA

T E S I S

que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

LIBB Mariana Ramos Brossier

Directora de Tesis

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva
Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité de Tesis certificamos que la tesis elaborada por Mariana Ramos Brossier, cuyo título es: “Regulación de la señalización dependiente de los receptores a dopamina tipo D1 y D2 en el estriado lesionado de la rata albina” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Salvador Hernández López

Secretario (Tutor)

Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola

Vocal

Dr. José Fernando Peña Ortega

Suplente

Dra. Brenda Rocío Anguiano Serrano

Suplente

Dr. Francisco Vázquez Cuevas

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

RESUMEN

Datos conductuales sugieren que el estriado experimenta cambios plásticos en respuesta a una lesión con ácido kaínico (AK) que dependen del género y del tiempo. Estos cambios podrían involucrar a los receptores de dopamina ya que son esenciales para la regulación de la actividad locomotora normal, y que han sido implicados en la modulación de las alteraciones conductuales observadas en enfermedades y modelos de neurodegeneración estriatal.

El objetivo de este trabajo fue determinar si existen alteraciones en los receptores de dopamina y su vía de señalización en el estriado después de una lesión con AK, y si estos cambios dependen del tiempo y del género.

Se lesionó unilateralmente el estriado de ratas de ambos sexos con AK. Siete y 30 días después de la lesión se determinó la abundancia del mRNA y la proteína de los receptores de dopamina D1R y D2R, así como el estado de fosforilación de proteínas importantes para la señalización de estos receptores, las ERK1/2 y DARPP32. Se encontraron cambios tanto en el estriado lesionado como en el estriado contralateral a la inyección, y estos cambios fueron diferentes entre los tiempos post lesión evaluados, así como entre géneros. Este estudio sugiere que existe una respuesta diferencial a la lesión dependiendo del género y del tiempo, y contribuye a determinar la participación de los receptores de dopamina en la remodelación estriatal después de un daño o patología, como la enfermedad de Huntington, en la cual el tiempo y el género tienen un papel importante.

SUMMARY

Behavioural data suggest that the striatum undergoes plastic changes after a kainic acid (KA) lesion, that are gender and time dependent. These changes could involve the dopamine receptors, since they are essential for normal striatal function, and have been implicated in the modulation of behavioral changes observed in striatal diseases as well as in animal models of striatal neurodegeneration.

The objective of this work is to determine if there are alterations in dopamine receptor and its signaling after a KA induced striatal lesion, and if these changes are gender and time dependent.

We lesioned unilaterally the striatum of both male and female rats with KA. Seven and 30 days after lesion we determined the mRNA and protein abundance of D1R and D2R dopamine receptors, and evaluated the phosphorylation state of ERK1/2 and DARPP32. We found differences in the KA injected striatum as well as in the contralateral striatum. Those changes were different between 7 and 30 days post lesion, and between males and females. This study suggests a differential response to the lesion, depending on gender and on time, and contributes to determine the participation of dopamine receptors in the striatal changes elicited after injury and pathology, such as Huntington's disease, in which time and sex play a determinant role.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No. 220961) y la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Becario No. 301725844).

Al apoyo brindado por la Unidad de Enseñanza (Leonor Casanova Rico), la Unidad de Microscopía (Nydia Hernández Ríos), la Unidad de Proteogenómica (Dra. Anaid Antaramián Salas y M. en C. Adriana González Gallardo), al personal de la Biblioteca (Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, Román Pacheco Barrita), el bioterio (MVZ José Martín García Servín y Elsa Ruíz Martínez), la Unidad de Videoconferencia (Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala) del Instituto de Neurobiología, UNAM.

A la Dra. Magda Giordano, por el apoyo y la confianza brindados a lo largo de estos dos años. A la Dra. Verónica Rodríguez Córdoba, a la Biol. Soledad Mendoza Trejo, al Dr. Jorge H. Limón Pacheco, y a todos los miembros del laboratorio de plasticidad neuronal del INB.

A la Dra. Brenda Anguiano Serrano, al Dr. Salvador Hernández López, al Dr. Fernando Peña Ortega y al Dr. Francisco Vázquez Cuevas, por las sugerencias aportadas a este trabajo.

Al Dr. Jorge H. Limón Pacheco, Dra. Brenda Anguiano Serrano, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y al Dr. Benjamín Florán Garduño por las ideas y apoyo aportados a este proyecto durante toda la maestría.

A los laboratorios de la Dra. Carmen Clapp, Dr. Ataulfo Martínez, Dra. Carmen Aceves, Dr. Mauricio Díaz, Dr. Benjamín Florán y Dr. Rogelio Arellano, por el apoyo en el préstamo de equipo.

Al apoyo técnico brindado por el Dr. Jorge Limón Pacheco, Biol. Soledad Mendoza Trejo, Dr. Francisco Vázquez Cuevas, Dra. Marisela Luna, Dra. Edith Espino, Dra. Claudia Rangel Barajas, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dra. Olivia Vázquez Martínez, Raúl Calderón Aguilera, Fernando Rodríguez Flores y Claudia González Flores.

Este trabajo fue auspiciado por PAPIIT (211709-3) y CONACyT (46161-M y 0103907).

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	ANTECEDENTES	3
3.1	Ganglios basales	3
3.1.1	Vía directa	4
3.1.2	Vía indirecta	6
3.2	Expresión y regulación de los receptores de dopamina en el estriado	6
3.2.1	Los receptores de dopamina y su vía de señalización en el estriado	7
3.2.2	Regulación de los receptores de dopamina estriatales en condiciones fisiológicas	12
3.2.3	Regulación de los receptores de dopamina en condiciones patológicas y en modelos animales	13
3.3	Excitotoxicidad por ácido kaínico en el estriado	15
3.3.1	Alteraciones en la actividad locomotora inducidas por lesiones estriatales con AK 16	
4	JUSTIFICACIÓN	18
5	HIPÓTESIS	19
6	OBJETIVOS	20
7	MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1	Sujetos	21
7.2	Inyección estriatal con PBS o AK	21
7.3	Determinación de la fase del ciclo estral en las ratas hembra	21
7.4	Evaluación de la actividad locomotora espontánea	21
7.5	Histología	22
7.6	Homogenización del estriado y obtención de membranas	22

7.7	Western blot	23
7.8	PCR tiempo real	24
7.9	Ensayos de unión de radioligando de un solo punto	24
7.10	Análisis estadístico	25
8	RESULTADOS	26
8.1	Registro de la actividad locomotora espontánea en ratas lesionadas unilateralmente con AK	26
8.2	Caracterización histológica de la lesión inducida por la inyección estriatal unilateral de AK	27
8.3	Ensayos de unión a radioligando de un solo punto	30
8.3.1	Unión de ³ [H] SCH 23390 a membranas estriatales	30
8.3.2	Unión de ³ [H] spiperona a membranas estriatales	31
8.4	Evaluación por Western blot de la abundancia relativa de la proteína de los receptores de	31
8.4.1	Abundancia relativa de la proteína de D1R	31
8.4.2	Abundancia relativa de la proteína de D2R	33
8.5	Evaluación por PCR tiempo real de la abundancia del mRNA de los receptores de DA	34
8.5.1	Abundancia relativa del mRNA de D1R	34
8.5.2	Abundancia relativa del mRNA de D2R	35
8.6	Evaluación de la fosforilación de Thr ⁷⁵ de DARPP32	36
8.1	Evaluación del estado de fosforilación de las ERK1/2	37
9	DISCUSIÓN	39
9.1	Actividad locomotora espontánea y muerte neuronal en el estriado después de una lesión unilateral con AK	39
9.2	Receptores de dopamina	40
9.2.1	D1R	41
9.2.2	D2R	42
9.3	Cambios en la vía de señalización de los receptores de DA	43

9.4	Heterogeneidad celular y relevancia funcional	44
10	CONCLUSIONES	48
11	BIBLIOGRAFÍA	49
12	LISTA DE FIGURAS	59
13	APÉNDICE I	61
13.1	Actividad de citocromo oxidasa en el estriado lesionado con AK	61
14	APÉNDICE II	63
14.1	Evaluación de la unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 a membranas estriatales	63
14.2	Evaluación de la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona a membranas estriatales	64
14.3	Evaluación de la abundancia relativa de la proteína de D1R	65
14.4	Evaluación de la abundancia relativa de la proteína de D2R	65
14.5	Evaluación de la abundancia relativa del mRNA de D1R	67
14.6	Evaluación de la abundancia relativa del mRNA del receptor de dopamina D2R _L	68
14.7	Evaluación del estado de fosforilación de DARPP32	70
14.8	Evaluación del estado de fosforilación de ERK1/2	71
15	APÉNDICE III	72
15.1	Determinación del ciclo estral en ratas hembra	72
16	APÉNDICE IV	73
16.1	Estandarización de la reacción de RT PCR tiempo real	73

1 ABREVIATURAS

6-OHDA	6- hidroxidopamina
AK	Ácido kaínico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5- metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina 3'-5' monofosfato cíclica
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc
EH	Enfermedad de Huntington
ERK1/2	Cinasas reguladas por estímulos extracelulares 1 y 2
GABA	Ácido γ -amino butírico
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar astrocítica
GPL/m	Globo pálido lateral / medio
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
NMDA	N-metil-D-aspartato
NME	Neurona mediana espinosa
NeuN	Proteína nuclear neuronal
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PKA	Proteína cinasa A
PP1	Proteína fosfatasa 1
PBS	Amortiguador de fosfatos
SNr/c	Sustancia nigra pars reticulata / compacta

2 INTRODUCCIÓN

Evidencia conductual y bioquímica indica que después de una lesión estriatal con ácido kaínico (AK, un agonista potente de un subtipo de receptores de glutamato) se llevan a cabo cambios en el estriado que dependen del tiempo y del género (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001; Schwarcz y Coyle, 1977; Weinreich y Seeman, 1980; Zaczek et al., 1978). En este trabajo se evaluó si como parte de esta remodelación estriatal existen cambios en la abundancia del mARN y la proteína, así como en la vía de señalización de los receptores de dopamina D1R y D2R, y si estos cambios dependen del género y del tiempo post lesión.

Para abordar este problema se inyectó unilateralmente AK o PBS como control, en el estriado de ratas de ambos sexos. Siete y 30 días después de la lesión se evaluó por PCR de tiempo real la abundancia del mARN de los receptores de dopamina D1R y D2R, mientras que la abundancia de la proteína de estos receptores así como el estado de fosforilación basal de las ERK1/2 y de DARPP32 (proteínas involucradas en la señalización mediada por la activación de estos receptores) se evaluaron por Western blot. Además se evaluó la unión a radioligandos selectivos para cada receptor.

Con respecto a los animales control, se encontraron cambios en los receptores de dopamina tanto en el estriado lesionado con AK como en el estriado contralateral a la inyección, y estos cambios fueron diferentes entre los tiempos post lesión evaluados así como entre géneros. Este estudio sugiere que existe una respuesta diferencial a la lesión dependiendo del género y del tiempo, y contribuye a determinar la participación de los receptores de dopamina en la remodelación estriatal después de un daño o patología, como la enfermedad de Huntington, en la cual el tiempo y el género tienen un papel importante.

3 ANTECEDENTES

3.1 Ganglios basales

Los ganglios basales están compuestos por varios núcleos subcorticales, incluyendo el caudado y el putamen (estriado en la rata), el globo pálido, el núcleo accumbens, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (Graybiel, 2000).

Los ganglios basales tienen un papel esencial en la integración de la información sensorimotora, asociativa y límbica para producir la conducta motora (Graybiel, 2008). Los circuitos neuronales involucrados forman una parte fundamental del sistema motor extrapiramidal, y la disfunción de estos circuitos está asociada con enfermedades como el Parkinson y el Huntington (Graybiel, 2000).

El núcleo de entrada principal de los ganglios basales es el estriado, el cual recibe aferencias glutamatérgicas y dopaminérgicas, y manda proyecciones a las estructuras de salida de los ganglios basales, el globo pálido medio (GPm) y sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Parent y Hazrati, 1995).

El estriado recibe aferencias de las neuronas piramidales corticales principalmente (Gerfen, 1989), aunque también recibe aferencias glutamatérgicas provenientes del tálamo (Dube et al., 1988; Gimenez-Amaya et al., 1995), aferencias dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra pars compacta (Bentivoglio et al., 1979), y aferencias serotoninérgicas del núcleo de raphe (De Simoni et al., 1987).

Las aferencias glutamatérgicas corticales proyectan al estriado de forma organizada topográficamente y definen así regiones funcionalmente distintas: el estriado dorsolateral recibe aferencias de áreas sensorimotoras (Jones et al., 1977; Takada et al., 1998), el estriado central de áreas corticales asociativas (Parthasarathy et al., 1992; Saint-Cyr et al., 1990; Van Hoesen et al., 1981) y el estriado ventral recibe aferencias de áreas límbicas (Haber et al., 1995; Kunishio y Haber, 1994).

El 5% de las células estriatales está formado por interneuronas, que se dividen en dos clases dependiendo de sus características morfológicas, neuroquímicas y patrón de disparo: las interneuronas gigantes colinérgicas y las interneuronas medianas GABAérgicas (Kawaguchi, 1993). A su vez las interneuronas GABAérgicas se

subdividen de acuerdo al neuropéptido que expresan (pavalbúmina, calretinina ó neuropéptido Y, somatostatina y NADPH diaforasa) (Kawaguchi et al., 1995). Esta gran variedad de interneuronas tiene un papel central en la modulación de la actividad de las neuronas medianas espinosas (NME), que son el tipo celular más abundante en el estriado (95% en roedores).

Las NME son células GABAérgicas que constituyen las neuronas de proyección del estriado y en ellas convergen los estímulos glutamatérgicos provenientes de la corteza cerebral y del tálamo, así como las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra pars compacta (Gerfen, 1992). Los receptores de glutamato de tipo AMPA y NMDA en las NME son responsables de la mayoría de la neurotransmisión excitatoria en el estriado, mientras que los receptores de dopamina (DA) tienen un papel modulador de la función y excitabilidad de estas neuronas (Onn et al., 2000), ya que regulan la apertura y tráfico de canales iónicos en la membrana celular, lo cual cambia la forma en que estas neuronas responden a las señales glutamatérgicas (Di Chiara et al., 1994; Kotter, 1994). La importancia de la acción moduladora de la DA en el estriado es evidente en los desórdenes del movimiento asociados con daños en esta estructura, como en la enfermedad de Huntington (en donde mueren las NME estriatales (Reddy et al., 1999)), y de Parkinson (en donde mueren las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Lozano et al., 1998)). Las neuronas medianas espinosas forman dos poblaciones, dependiendo de la expresión de receptores de DA, de neuropéptidos, y de la forma en que proyectan a los núcleos de salida de los ganglios basales, como se describirá más adelante. Gracias a estas diferencias y a los estudios realizados en ratones transgénicos BAC (que expresan GFP bajo la influencia del promotor de los subtipos de receptores de DA (Valjent et al., 2009), se han podido describir las características anatómicas y funcionales de las NME que forman la vía indirecta y la vía directa.

3.1.1 Vía directa

La vía directa o estriato nigral (representada por una línea punteada color naranja en la figura 1) se origina de las neuronas medianas espinosas estriato nigrales (47–53% de las NME en roedores) (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Estas neuronas proyectan a las

neuronas GABAérgicas del globo pálido medio (GPm) y de la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Estos núcleos de salida a su vez proyectan a los núcleos ventrales anterior y lateral del tálamo. Así, el efecto neto de la actividad de la vía directa es la desinhibición de las proyecciones tálamo corticales excitadoras, resultando en la activación de circuitos corticales pre motores y la facilitación del movimiento (Alexander y Crutcher, 1990).

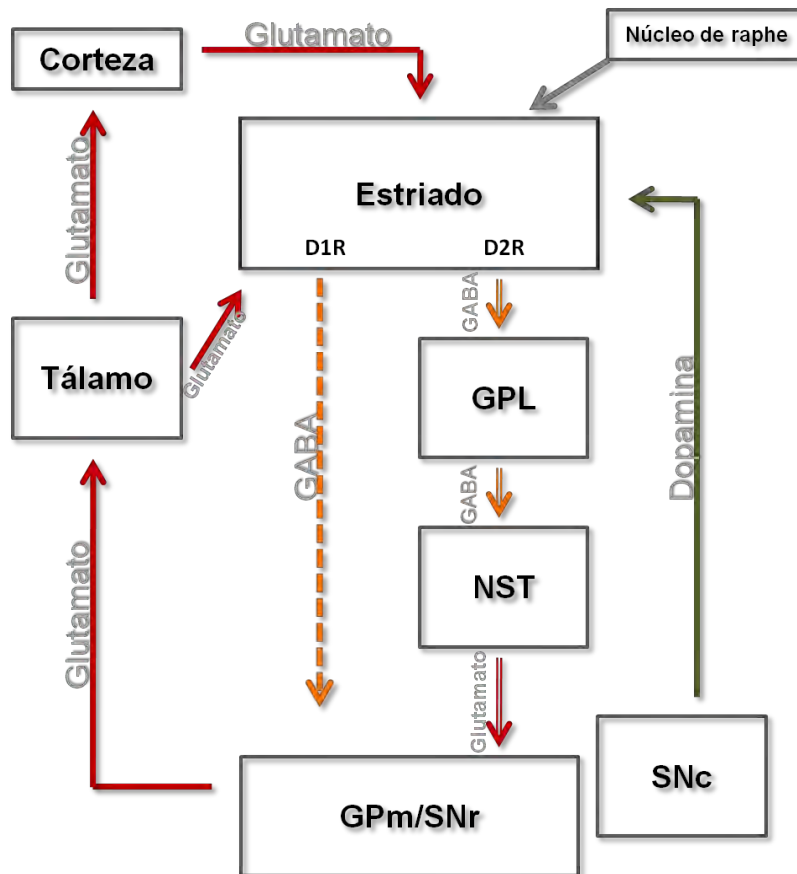


Figura 1. Circuito simplificado de los ganglios basales en la rata.

En rojo están representadas las proyecciones glutamatérgicas, en verde las dopaminérgicas, y en naranja las GABAérgicas. La vía directa de proyección estriatal está representada con D1R (flecha punteada color naranja), mientras que la vía indirecta está representada con D2R (flechas con línea doble). GPL, globo pálido lateral; GPm, globo pálido medio; NST, núcleo subtalámico; SNr, sustancia nigra pars reticulata; SNC, sustancia nigra pars compacta.

Las NME de la vía directa presentan más dendritas primarias, son menos excitables que las NME de la vía indirecta (Cepeda et al., 2008; Gertler et al., 2008) y forman sinapsis con otras neuronas de la vía directa dentro del estriado (Taverna et al., 2008). Las NME estriato nigrales expresan sustancia P, dinorfina (Ahlgren-Beckendorf y

Levant, 2004; Chesselet y Graybiel, 1983) y altos niveles de receptores de DA tipo D1R (Beckstead, 1988; Gerfen et al., 1990; Valjent et al., 2009).

3.1.2 Vía indirecta

La vía indirecta o estriato palidal (representada por flechas color naranja dobles en la figura 1) se origina de las neuronas medianas espinosas estriato palidales, que constituyen el 36–43% de las NME del estriado en roedores (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Estas neuronas forman sinapsis inhibitoras con las neuronas GABAérgicas del globo pálido lateral (GPL), quienes proyectan a las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico (NST). Las neuronas de este núcleo mandan aferencias glutamatérgicas al globo pálido medial (GPM) y a la sustancia nigra pars reticulata (SNr), donde forman sinapsis con las neuronas inhibitoras de estos núcleos. Así, el efecto neto de la actividad de esta vía resulta en la inhibición de las neuronas de proyección tálamo corticales, las cuales reducen la actividad de la corteza premotora, inhibiendo el movimiento (Alexander y Crutcher, 1990).

Las neuronas de la vía indirecta pueden formar sinapsis con NME tanto de la vía directa como de la indirecta en el estriado, y son más excitables que las NME de la vía directa (Cepeda et al., 2008; Gertler et al., 2008). Las NME estriato palidales expresan encefalina (Beckstead y Kersey, 1985; Chesselet y Graybiel, 1983) y una gran cantidad de receptores D2R (Ahlgren-Beckendorf y Levant, 2004; Chesselet y Graybiel, 1983).

A pesar de la aparente segregación funcional de las NME de las vías directa e indirecta, basada en la expresión diferencial de los receptores de DA, se ha descrito que el ~5-6% de las NME de roedores expresan D1R y D2R (Bertran-Gonzalez et al., 2008). No se conoce aún la función de esta población de neuronas en el estriado.

3.2 Expresión y regulación de los receptores de dopamina en el estriado

Los receptores de DA se clasifican por su estructura y su farmacología en dos subfamilias, D1R (D1R y D5R) y D2R (D2R, D3R y D4R). En el estriado se expresan abundantemente los receptores de dopamina D1R y D2R, mientras que los receptores

D3R (Diaz et al., 1995), D4R (Noain et al., 2006; Rivera et al., 2002) y D5 (Rivera et al., 2002) se expresan poco.

Los receptores D1R están localizados a nivel post sináptico, principalmente en neuronas medianas espinosas. Existen dos variantes de los receptores D2R generadas por “splicing” alternativo, D2R_S y D2R_L (Dal Toso et al., 1989). Los receptores D2R_S se localizan a nivel pre sináptico, en las neuronas dopaminérgicas y en fibras aferentes no dopaminérgicas donde actúan como autorreceptores (Centonze et al., 2002). Los D2R_L se localizan a nivel post sináptico en neuronas GABAérgicas de proyección (David et al., 2005; Khan et al., 1998; Lindgren et al., 2003). Los receptores D2R y D5R se expresan también en interneuronas (Alcantara et al., 2003; Rivera et al., 2002) en donde participan en la regulación de la liberación de acetilcolina, inhibiéndola o facilitándola, respectivamente (Wang et al., 2006). La transmisión dopaminérgica en estas interneuronas tiene un papel importante en el procesamiento estriatal de las aferencias extrínsecas, así como en la plasticidad sináptica (Calabresi et al., 2007). Esto resalta la importancia de las interneuronas colinérgicas como mediadoras de la comunicación entre NME de ambas vías.

3.2.1 Los receptores de dopamina y su vía de señalización en el estriado

Entre las diferencias que distinguen a las dos familias de receptores de DA, se encuentra la forma en la que se acoplan a diferentes moléculas de señalización para mediar los efectos de la DA en las NME. Nuestro estudio se centra en los receptores D1R y D2R, debido a que los efectos postsinápticos de la DA en el estriado son mediados principalmente por estos subtipos, además de ser los más abundantes en esta estructura (Hersch et al., 1995).

Como se muestra en la figura 2, los receptores D1R están acoplados positivamente a la enzima adenilato ciclasa a través de una proteína G_{olf} (Beckstead, 1988; Herve et al., 1995). El aumento del AMPc resultado de la activación de la adenilato ciclasa tiene como consecuencia la activación de la proteína cinasa A (PKA). Esto promueve la fosforilación de varios de los efectores de esta cinasa (Neve et al., 2004) como canales iónicos (Ca²⁺, K⁺ y Na²⁺), receptores de neurotransmisores (NMDA, AMPA, GABA),

factores de transcripción (CREB) y DARPP32 (Svenningsson et al., 2004), del cual se hablará más adelante. Se ha demostrado que la señalización de los D1R a través de la PKA aumenta la respuesta de las NME estriatonigrales a la liberación sostenida de glutamato (que mantiene a las NME en un estado despolarizado), pero que reduce su respuesta a la liberación transitoria de este neurotransmisor excitador (que no es capaz de despolarizar la membrana) (Surmeier et al., 2007).

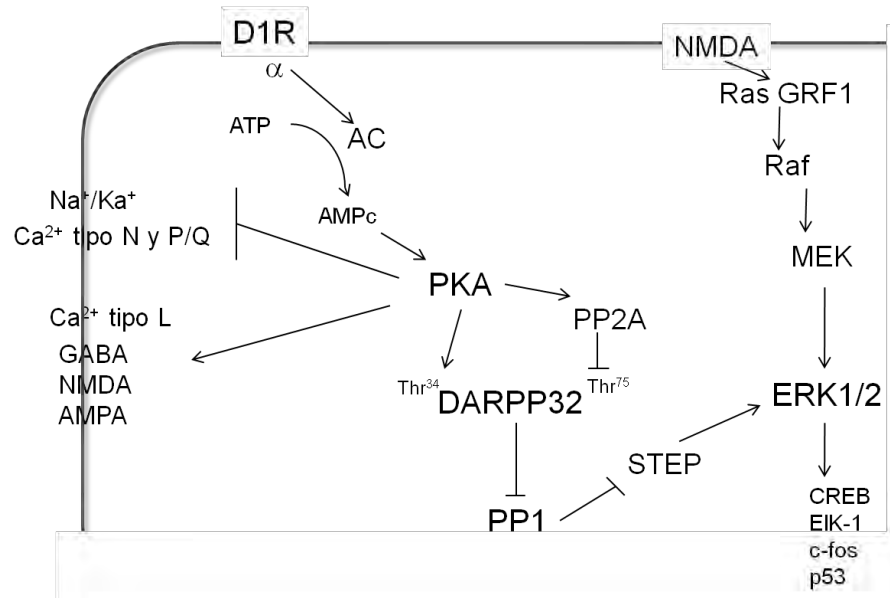


Figura 2. Vía de señalización intracelular mediada por los receptores de dopamina D1R en las NME de la vía directa.

Como se muestra en la figura 3, los receptores D2R están acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (Montmayeur et al., 1993), que a través de la subunidad G_{α_i} inhiben la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Las subunidades $G_{\beta\gamma}$ inhiben la apertura de canales de calcio y estimulan a la fosfolipasa C_{β} (PLC_{β}), generando diacilglicerol (DAG) y e inositol (1, 4, 5) trifosfato (IP_3). Estos eventos promueven la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la movilización de calcio intracelular (Hernandez-Lopez et al., 2000). Los receptores D2R son capaces de regular negativamente la actividad de canales, como los de Ca^{2+} y receptores membranales, como GABA y NMDA (Neve et al., 2004). Así, los receptores D2R reducen la excitabilidad de las neuronas estriato palidales y su respuesta a las aferencias glutamatérgicas (Neve et al., 2004; Surmeier et al., 2007).

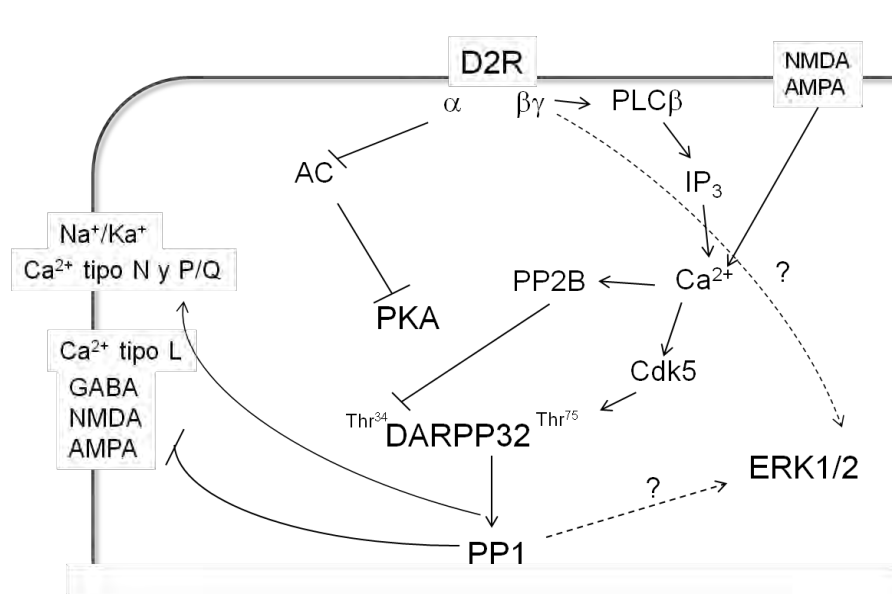


Figura 3. Vía de señalización intracelular mediada por los receptores de dopamina D2R en las NME de la vía indirecta.

3.2.1.1 DARPP-32

La fosfoproteína de 32 KDa regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32, por sus siglas en inglés) es una proteína clave para la señalización intracelular de los receptores de dopamina D1R y D2R (Svenningsson et al., 2004) ya que como me describiré más adelante, media la regulación del estado de fosforilación y actividad de los efectores fisiológicos en las NME, como canales iónicos dependientes de voltaje y factores de transcripción (Greengard et al., 1999; Svenningsson et al., 2004). Se ha demostrado la expresión de DARPP32 en neuronas que reciben aferencias dopaminérgicas (Walaas et al., 1983), y se encuentra muy enriquecida en estriado.

Como se muestra en la figura 2, cuando se estimulan los receptores de dopamina D1R, DARPP-32 es fosforilada por la PKA en la Thr³⁴ (Nairn et al., 2004). De esta forma DARPP-32 regula negativamente a la proteína fosfatasa 1 (PP1) interactuando con ella (Kwon et al., 1997), evitando así la desfosforilación de otros blancos de la PKA, entre ellos canales iónicos y receptores (Flores-Hernandez et al., 2000; Snyder et al., 1998). Al mismo tiempo, la activación de la PKA activa a la PP2A, promoviendo así la desfosforilación de la Thr⁷⁵ de DARPP32 (Ahn et al., 2007).

Cuando se estimulan los receptores de dopamina D2R (Figura 3), se promueve la fosforilación de DARPP-32 en la Thr⁷⁵ por la Cdk5 (Bibb et al., 1999), y disminuye la desfosforilación de la Thr⁷⁵ por PP2A (Nishi et al., 1997). La estimulación de los D2R induce además la activación de la PP2B (Nishi et al., 1997), la cual desfosforila la Thr³⁴ de DARPP32, liberando a la PP1 y promoviendo la desfosforilación los efectores fosforilados por PKA. La activación de los receptores de glutamato también promueve la fosforilación de la Thr³⁴ de DARPP32, a través del incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular (Halpain et al., 1990; Nishi et al., 2005).

Gracias a su habilidad para modular la actividad de la PP1 y la PKA, DARPP-32 está involucrada en la regulación de las respuestas electrofisiológicas, transcripcionales y conductuales a estímulos fisiológicos (como glutamato y dopamina) y farmacológicos (como drogas de abuso) (Nishi et al., 2000).

Usando ratones transgénicos BAC se han podido estudiar los estímulos que promueven la fosforilación de DARPP32. Bateup et al., (2008) observaron que la cocaína (que bloquea la recaptura de DA en las terminales sinápticas, aumentando la transmisión dopaminérgica) aumenta la fosforilación de DARPP32 en la Thr³⁴ únicamente en las NME de la vía directa, mientras que el haloperidol (un antagonista de los D2R) aumenta la fosforilación en este sitio únicamente en las NME de la vía indirecta. Este trabajo sugiere que los efectos conductuales de ciertas drogas pueden deberse a una regulación diferencial de la fosforilación de DARPP32 en las diferentes poblaciones neuronales del estriado.

3.2.1.2 ERK 1/2

Una de las vías de señalización inducida por la activación de los receptores de DA involucra a miembros de la familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Neve et al., 2004). La cascada de señalización de estas cinasas es una de las vías más importantes encargadas de transmitir señales de la membrana celular al núcleo, y una de sus funciones más importantes es la regulación de la expresión genética a través de la fosforilación de factores de transcripción (Lopez-Illasaca, 1998).

En el sistema nervioso central dos miembros de esta familia de cinasas, la ERK1 y la ERK 2, se han relacionado con la plasticidad neuronal (Impey et al., 1999), regulando la actividad de factores de transcripción como NF- κ B, c-fos, CREB, zif/268 y Elk-1 (Murray et al., 1998; Vanhoutte et al., 1999) para promover la supervivencia y la proliferación.

La activación de las ERK1/2 mediada por los receptores D1R (Figura 2) depende de la activación de la PKA y de DARPP32/PP1, que regulan la actividad de la fosfatasa enriquecida en el estriado (STEP, por sus siglas en inglés) (Valjent et al., 2005). El mecanismo de activación de las ERK1/2 dependiente de los receptores D2R en las NME está en controversia ya que parece depender del agonista o antagonista utilizado así como del tipo celular estudiado (Cai et al., 2000; Gerfen et al., 2002; Liu et al., 2008). Sin embargo, la cascada de activación de las ERK1/2 mejor caracterizada consiste en la participación de Ras, Raf, y MEK, que ha sido descrita en respuesta a la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato (Mao et al., 2004).

Valjent et al., (2005) y Fasano et al., (2009) han demostrado que las dos vías de activación de las ERK1/2, la dependiente de los receptores de DA y la Ras-MEK dependiente de los receptores de glutamato, convergen en el estriado. En ambos estudios encontraron que la activación de ERK2 dependiente de los receptores de glutamato (NMDA) y de DA (D1R/D5R) es abatida totalmente bloqueando cualquiera de estos receptores con antagonistas. Estos resultados indican que es necesario un diálogo cruzado (“crosstalk”) de los receptores de DA y los de glutamato en las NME para activar las ERK. Así, se ha sugerido que la activación de las ERK1/2, regulada por DARPP-32, funciona como un detector de coincidencias de las señales glutamatérgicas y dopaminérgicas que convergen en las neuronas estriatales (Bertran-Gonzalez et al., 2008).

La expresión de los receptores de DA en el estriado varía en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. A continuación se mencionan algunos ejemplos.

3.2.2 Regulación de los receptores de dopamina estriatales en condiciones fisiológicas

Diferencias inter hemisféricas. Se han descrito diferencias inter hemisféricas en la abundancia de los receptores D1R y D2R (Drew et al., 1986; Glick et al., 1988; Schneider et al., 1982). A pesar de las inconsistencias en la literatura, se ha reportado que en hembras existe una mayor abundancia de D2R (B_{max}) en el estriado derecho (40%) que en el estriado izquierdo, medido por unión al antagonista $^3[H]$ spiperona (Drew et al., 1986). En machos se ha descrito mayor unión a este radioligando en el estriado izquierdo (23%) comparado con el derecho (Schneider et al., 1982). Sin embargo, estas observaciones parecen depender de la cepa de rata utilizada en cada estudio, ya que también se ha reportado que los valores de B_{max} son más altos en el estriado izquierdo para D1R y D2R, y que no hay diferencias entre machos y hembras (Glick et al., 1988). La asimetría inter hemisférica de los receptores de DA también se ha observado en humanos, usando tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) (Larisch et al., 1998).

Regulación hormonal. A pesar de las observaciones contradictorias producidas por las diferencias en la estrategia experimental, varios trabajos han descrito que la densidad de D1R y D2R en el estriado fluctúa durante el ciclo estral y que puede ser modulada por esteroides gonadales (Di Paolo et al., 1988; Hruska et al., 1982; Levesque et al., 1989; Levesque y Di Paolo, 1993). Así, se ha descrito que el D1R fluctúa durante el ciclo estral de la rata (Levesque et al., 1989), aumentando su densidad en el diestro, mientras que la afinidad pero no la densidad de D2R aumenta en el diestro (Di Paolo et al., 1988). Se ha descrito que el tratamiento con estrógenos aumenta la densidad estriatal de D2R, sin alterar su afinidad (Hruska et al., 1982; Levesque y Di Paolo, 1993). La supresión crónica de hormonas gonadales por ovariectomía induce un decremento en los receptores D1R estriatales comparado con hembras intactas (Levesque et al., 1989). Sin embargo a tiempos más cortos (1-4 días) se observó un aumento en los niveles de este receptor (Levesque y Di Paolo, 1990). Si bien los mecanismos aun no están claros, estas manipulaciones han permitido determinar el componente hormonal de la regulación de D1R y D2R.

Regulación circadiana. Estudios de unión de ligando muestran que la expresión de los receptores de DA tiene características circadianas (Wirz-Justice, 1987). En particular, un estudio de Akhisaroglu et al., (2005) muestra que los niveles de proteína de los receptores D2R y D3R aumentan durante la fase de luz.

Edad. Durante el desarrollo se han observado diferencias en la expresión del mRNA de todos los miembros de las dos familias de receptores de DA (Xu et al., 1992; Araki et al., 2007). Asimismo se ha reportado la disminución de la expresión de D1R y D2R con la edad en humanos y en ratas (Ishibashi et al., 2009; Suzuki et al., 2001; Zhang et al., 1997).

3.2.3 Regulación de los receptores de dopamina en condiciones patológicas y en modelos animales

Enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de inervación dopaminérgica en el estriado, debida a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En estudios de pacientes con esta enfermedad, así como en algunos modelos animales se ha reportado un aumento de la proteína del D2R y una ligera disminución en la expresión del mRNA y de la proteína del D1R (Qin et al., 1994; Xu et al., 2005). Después de evaluar los niveles de D1R por autoradiografía, se observó que 2 semanas después de una lesión unilateral con 6-OHDA (que induce la muerte de las neuronas de la SNc) estos receptores disminuyen en el estriado, sin importar si la lesión fue realizada en la SNc del lado derecho o izquierdo (Xu et al., 2005). Sin embargo, se observó un aumento mayor en los niveles estriatales de D2R cuando la lesión fue realizada en la SNc del lado derecho, comparado con el aumento observado en lesiones de la SNc del lado izquierdo (Xu et al., 2005). Esto pone en evidencia la importancia de la lateralización de estos receptores en los mecanismos compensatorios observados después de una lesión.

Además de los cambios reportados en la abundancia de los receptores de DA, una de las modificaciones más importantes en el estriado después de la denervación dopaminérgica es la supersensibilidad de la respuesta de estos receptores (Ungerstedt, 1971). Esta supersensibilidad se ha explicado como cambios en elementos de la vía de señalización de los receptores de DA, ya que en el estriado denervado se encuentra

una mayor fosforilación en la Thr⁷⁵ de DARPP32 (Brown et al., 2005), así como inducción de genes de expresión temprana como *c-fos* (Johnson et al., 1992), y mayor fosforilación de CREB (Cole et al., 1994) y de las ERK1/2, mediada por la activación del D1R (Gerfen et al., 2002).

Enfermedad de Huntington. La enfermedad de Huntington es un trastorno genético autosómico dominante que se caracteriza por la pérdida progresiva y selectiva de las NME en el estriado. Esta enfermedad es causada por una expansión de poliglutamina en el extremo N terminal de la proteína huntingtina (Gil y Rego, 2008). La neurodegeneración estriatal en esta enfermedad produce alteraciones motoras progresivas y deficiencias cognitivas. Aun se desconoce el mecanismo molecular que causa la neurodegeneración selectiva de las NME, pero el estudio de Paoletti et al., (2008) sugiere un mecanismo que involucra la participación de los receptores de glutamato y los de DA en la vulnerabilidad de las neuronas estriatales a la toxicidad por la huntingtina mutante.

En estudios post mortem se ha reportado que en el estriado de pacientes con enfermedad de Huntington hay una disminución en ambas familias de receptores de DA (Glass et al., 2000; Richfield et al., 1991), lo cual se ha corroborado en estudios de PET (Turjanski et al., 1995). De acuerdo con estos datos se ha encontrado una reducción significativa en la densidad de receptores y del mRNA de D1R y D2R en el estriado de modelos animales de enfermedad de Huntington (Ariano et al., 2002; Cha et al., 1998), así como deficiencias en la señalización de DA, que incluyen una reducción en los blancos específicos del receptor de dopamina D1R como PKA y DARPP-32 (Bibb et al., 2000).

Los cambios observados en los niveles de receptores de DA resaltan su importancia en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, en los cuales interviene la edad, el estado hormonal y los ritmos biológicos.

3.3 Excitotoxicidad por ácido kaínico en el estriado

El AK es un potente agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA/kainato que ha sido utilizado en el sistema nervioso central como modelo de neurodegeneración (Collingridge y Lester, 1989; Lerma, 2004). Esta excitotoxina aislada del alga *Digenea simplex* es un excitador 30 a 100 veces más potente que el glutamato (Meltzer, 1987).

Las neuronas estriatales expresan una gran cantidad de receptores AMPA/AK, lo cual las vuelve vulnerables a la excitación por AK (Chen et al., 1996; Wisden y Seeburg, 1993). Sin embargo, se ha observado en estudios *in vitro* que las NME que expresan receptores de dopamina D2R son más vulnerables a esta excitotoxina que las que expresan receptores D1R (Mesco et al., 1992). La excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA/AK en el estriado presenta ciertas características de necrosis y de apoptosis (Nakai et al., 2000; Wang et al., 2006), producto de alteraciones en el flujo iónico y aumento del calcio intracelular, que tiene como consecuencia trastornos en el metabolismo energético y formación de radicales libres que redundan en estrés oxidante (Wang et al., 2005).

Las características neuroquímicas y las consecuencias conductuales de la lesión estriatal con AK cambian significativamente a diferentes tiempos después de la lesión (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001; Schwarcz y Coyle, 1977; Weinreich y Seeman, 1980; Zaczek et al., 1978). Entre los cambios neuroquímicos reportados en el estriado 10 días post lesión se encuentra disminución de la actividad de la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) y de la acetilcolintransferasa (ChAT), así como disminución de la concentración de GABA y acetilcolina (Schwarcz y Coyle, 1977; Weinreich y Seeman, 1980; Zaczek et al., 1978). La disminución de la actividad de GAD y ChAT permanece incluso 9 meses después de la lesión, mientras que el nivel de GABA y de acetilcolina se restablece (Schwarcz y Coyle, 1977).

La unión de $^3\text{[H]}$ GABA en el estriado aumenta 200%, desde 48 horas hasta 10 días después de la inyección con AK, lo cual se ha interpretado como un aumento en la afinidad de los receptores de GABA (Campochiaro et al., 1977). Este valor disminuye hasta un 90% con respecto al control 9 meses post lesión, y no se sabe si corresponde

a una disminución en la densidad de receptores GABA o en su afinidad (Zaczek et al., 1978). Otro efecto observado después de la lesión con AK es una disminución de 43% de los receptores muscarínicos 10 días post lesión (Schwarcz y Coyle, 1977). Sin embargo, a diferencia de los receptores GABA, 9 meses post lesión los valores del receptor muscarínico son similares a los de animales no lesionados (Zaczek et al., 1978).

La actividad e inmunoreactividad de la tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la producción de DA) no cambia con respecto al estriado no lesionado (Schwarcz et al., 1980; Weinreich y Seeman, 1980), lo cual indica que las terminales dopaminérgicas de las proyecciones nigroestriatales no se dañan significativamente después de una lesión con AK.

Una característica de lesiones estriatales con AK es el aumento de glía reactiva (Matyja, 1986), lo cual también ha sido observado en diferentes lesiones en el sistema nervioso central (Schwarcz y Coyle, 1977; Sofroniew y Vinters, 2010; Strauss et al., 1994). El papel de esta glía reactiva es diverso: participación en los procesos de inflamación derivados de la lesión, recaptura del glutamato potencialmente excitotóxico, protección del estrés oxidativo a través de la producción de glutatión, neuroprotección a través de la liberación de adenosina, facilitación de la reparación de la barrera hematoencefálica, limitación de la inflamación, entre otras (Sofroniew y Vinters, 2010).

3.3.1 Alteraciones en la actividad locomotora inducidas por lesiones estriatales con AK

La muerte celular inducida con AK en el estriado se traduce en cambios conductuales que dependen del género y del tiempo de lesión (Giordano y Mejía-Viggiano, 2001). Giordano y Mejía Viggiano (2001) observaron que 7 días después de una inyección estriatal bilateral con AK en ratas de ambos sexos, éstas presentan hiperactividad (evaluada como aumento en la distancia total recorrida y número de movimientos verticales). Sin embargo a tiempos más largos después de la inyección (a partir de 30 días) la actividad locomotora es igual que la de las ratas control en ambos géneros, a pesar de una marcada muerte neuronal en el estriado.

Los cambios observados en la actividad locomotora espontánea después de la lesión no son iguales en hembras y en machos (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001). Aunque aumenta la distancia total recorrida desde 7 días después de la lesión en ambos géneros, el aumento es mayor en los machos. Además únicamente los machos presentaron aumento en el número de movimientos verticales desde 7 hasta 30 días post lesión.

A pesar de la aparente normalización de la actividad locomotora espontánea 30 días post lesión en ambos sexos, los efectos de la anfetamina (que aumenta la DA extracelular induciendo hiperactividad) son más marcados en las ratas inyectadas con AK 70 días después de la lesión (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001). De igual forma que en la actividad locomotora espontánea, las hembras fueron menos sensibles al efecto de la anfetamina. Sin embargo no se observa el efecto de la lesión al administrar haloperidol (un antagonista de los receptores D2R) 80 días después de la lesión, cuando todos los grupos mostraron el mismo nivel de hipoactividad. Estas observaciones indican que a tiempos largos post lesión existen cambios latentes, que no se manifiestan en la actividad locomotora espontánea, sino que sólo son observables después un reto farmacológico, como en este caso la anfetamina (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001).

Usando antagonistas de D1R y D2R, se ha sugerido que los cambios conductuales inducidos por lesiones estriatales con AK son mediados por estos receptores (Schwarcz et al., 1979; Vázquez I., 2006). Asimismo se ha reportado que la afinidad de la [H^3] spiperona por los receptores D2R postsinápticos no cambia 30 días después de la lesión, pero sin embargo la abundancia de estos receptores (B_{max}) se reduce alrededor de un 55% en el estriado inyectado con AK (Weinreich y Seeman, 1980).

Las características evaluadas después de una lesión estriatal con AK sugieren que el estriado lleva a cabo cambios plásticos en respuesta a una lesión y que los receptores de DA tienen un papel en estos procesos (Cai et al., 2000; Gerfen et al., 2002; Schwarcz et al., 1980; Xu et al., 1992).

4 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Huntington (EH) se caracteriza por la pérdida selectiva de las NME estriatales, característica que comparte con el modelo de excitotoxicidad por AK. Las consecuencias conductuales de la muerte de las NME del estriado inducida por esta excitotoxina dependen del género y del tiempo, al igual que las manifestaciones motoras de enfermedades neurodegenerativas estriatales, como la EH. Dado que los receptores estriatales de dopamina son esenciales para la regulación motora, es importante determinar si existen cambios en estos receptores que puedan explicar el deterioro motor después de una lesión excitotóxica y en patologías como la EH, así como su relación con el tiempo y el género.

5 HIPÓTESIS

Los cambios en los niveles de receptores de dopamina y en su vía de señalización después de una lesión con ácido kaínico en el estriado son diferentes entre hembras y machos, así como entre siete y treinta días después de la lesión.

6 OBJETIVOS

Determinar si la expresión relativa del mRNA y de la proteína de los receptores de dopamina D1R y D2R se encuentra alterada en el estriado de ratas lesionado con ácido kaínico.

Evaluar si existen alteraciones en la fosforilación basal de DARPP32 y de las ERK1/2 en el estriado después de una lesión unilateral con ácido kaínico.

Establecer si las alteraciones tanto en la abundancia de los receptores de dopamina como en la fosforilación de DARPP32 y ERK1/2, se asocian al tiempo post lesión y al género, evaluándolas siete y treinta días post lesión en ratas hembra y macho. Evaluar además si se presentan cambios en el estriado contralateral a la inyección con ácido kaínico.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sujetos

Se utilizaron 70 ratas hembra (~300 g) y 72 macho (~350 g) de la cepa Wistar y se mantuvieron bajo el ciclo invertido de luz/oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento. Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a los lineamientos establecidos por el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud” de la Secretaría de Salud (publicada en enero de 1987) y por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. Además los procedimientos fueron avalados por la Comisión de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM.

7.2 Inyección estriatal con PBS o AK

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina (70 mg/kg y 6 mg/kg, respectivamente). Se inyectó el estriado derecho (Paxinos y Watson (1982); AP + 1 mm hembras y + 1.2 mm machos, ML - 2.6 mm, DV – 5.5 mm) con 0.5 µl de PBS o con 5 nmol/0.5 µl AK disuelto en PBS, con ayuda de una bomba de infusión (0.1µl/min). Después de la cirugía se administró subcutáneamente 5 ml de solución Hartmann e intramuscularmente 300 000 UI de penicilina y 5 mg/kg de diazepam.

7.3 Determinación de la fase del ciclo estral en las ratas hembra

Antes del sacrificio de las ratas hembra se realizó un frotis vaginal y se observaron al microscopio óptico las características del epitelio vaginal, con ayuda de una tinción con azul de metileno (Marcondes et al., 2002).

7.4 Evaluación de la actividad locomotora espontánea

Siete y 30 post lesión se registró la actividad locomotora espontánea de las ratas (n = 5 para cada tratamiento, tiempo y género) a lo largo de 24 horas con un sistema automatizado (Digiscan Animal Activity System, AccuScan Electronics, Columbus, OH, USA). Los parámetros que se analizaron fueron distancia total recorrida (indica la

distancia recorrida (cm) por el sujeto en un tiempo de muestreo determinado), el número de movimientos verticales (número de incorporaciones que el sujeto realiza en un tiempo de muestreo determinado), el número de estereotipias (número de veces que el sistema registra actividad estereotipada) y número de movimientos (número de movimientos horizontales realizados por el sujeto en un tiempo de muestreo determinado).

7.5 Histología

Siete o 30 días después de la lesión se perfundieron las ratas (n = 3 para cada tratamiento, tiempo y género) con 500 ml de PBS y 500 ml de paraformaldehído al 4% en PB pH 7.4. Se extrajeron los cerebros, se colocaron en paraformaldehído durante 24 horas y se conservaron en sacarosa al 30% en buffer de fosfatos. Se obtuvieron cortes seriales de 50 μ m por congelación en un microtomo. Los cortes fueron procesados para detectar por inmunohistoquímica a la proteína neuronal nuclear NeuN (Chemicon, 1:10 000) y a la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, DAKO, 1:3000). Los cortes fueron incubados con un anticuerpo secundario biotinilado, y la reacción fue revelada utilizando un kit ABC (Vector Laboratories) y diaminobenzidina.

7.6 Homogenización del estriado y obtención de membranas

Un grupo de ratas (n = 5 para cada tratamiento, tiempo y género) se sacrificó por decapitación y se obtuvo el cerebro. Después de disecar el estriado inyectado (derecho) y contralateral a la inyección (izquierdo) se homogenizó el tejido en 10% m/v de buffer de extracción de proteínas (50 mM Tris, 50 mM fluoruro de sodio, 100 mM ortovanadato de sodio, 2 mM cloruro de magnesio, 1 mM EGTA, 0.5% Tritón X-100, 1 mM DTT, 0.2 μ M PMSF, inhibidores de proteasas y de fosfatasa) con ayuda de un homogenizador. Los homogenados fueron centrifugados a 1000 g durante 2 minutos. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Bradford, y se hicieron alícuotas juntando los estriados por condición.

El estriado de otro grupo de ratas (n = 5 para cada tratamiento, tiempo y género, excepto para hembras KA 7 días, n = 3) fue homogenizado en 10 volúmenes de buffer de extracción de proteínas y este homogenado se dividió a la mitad. Cada mitad fue

llevada a un volumen final de 2 ml con buffer de ensayo de radioligando para D1R (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4) o D2R (50 mM Tris, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7.4). Las muestras se centrifugaron a 49 000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue resuspendido en buffer D1R o D2R y se repitió la centrifugación. Las membranas se resuspendieron en 3 ml/80 mg de peso inicial y se determinó la concentración de proteínas usando el método de Bradford.

7.7 Western blot

Se cargaron 50 µg de proteína total en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 10V, la cual fue bloqueada con Blotto (Santa Cruz) al 5% en TBS-Tween 0.1%. Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpos específicos anti fosfoDARPP-32 Thr⁷⁵ (Cell Signaling, 1:100), anti fosfoERK1/2 (Cell Signaling, 1:1000), anti D1R (Calbiochem, 1:500), anti D2R_L y _S (Chemicon, 1:1000) en Blotto al 5% en TBS-Tween 0.1%. Posteriormente se incubó la membrana una hora con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Zymed, 1:10 000). Después de incubar la membrana con ECL Plus (GE Healthcare) se obtuvieron las imágenes en un escáner STORM 860 (Molecular Dynamics, fosfoERK, ERK, fosfoDARPP32 y DARPP32), o por exposición en placas Hiperfilm ECL (GE Healthcare, receptores de DA y GAPDH). Posteriormente se incubaron las membranas con buffer de stripping (100 mM β-mercaptoetanol, 2% w/v SDS, 62.5 mM Tris HCl, pH 6.7) a 65 °C durante 15 minutos, y después de bloquearlas con Blotto al 5%, se incubaron durante una hora con los anticuerpos específicos para DARPP32 (Cell Signaling, 1:1000), ERK1/2 (Cell Signaling, 1:1000), o GAPDH (Millipore, 1:2000). Se realizó un análisis semicuantitativo de las imágenes obtenidas usando el programa ImageJ (Rasband, W.S., 1997-2009). Las diferencias de la relación entre las proteínas fosforiladas y proteína total, así como la expresión de los receptores de DA con respecto a GAPDH, de las ratas lesionadas con AK con respecto a su control PBS, fueron analizadas en el lado ipsilateral y en el contralateral.

7.8 PCR tiempo real

Se aisló ARN a partir del estriado ($n = 5$ para cada tratamiento, tiempo y género) usando TRIZOL (Invitrogen) y se hizo un pool de cada condición con 2 μg de ARN de cada sujeto. Para sintetizar ADNc se incubaron 4 μg de este pool de ARN, junto con 2 μl de oligo d(T) (volumen final 36 μl) a 70 °C durante 5 minutos. Posteriormente las reacciones se colocaron en hielo durante 5 minutos y se añadió 10 μl de First strand Buffer RT Mix (Promega), 2 ml de dNTPs 10 mM (Invitrogen), y 2 ml de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). Las reacciones se incubaron durante una hora a 37 °C y 15 minutos a 70°C. Para el PCR tiempo real se armaron en capilares de vidrio (Roche) las siguientes reacciones por condición y por triplicado: 0.5 μl MgCl_2 + 1 μl de oligos específicos sentido y antisentido 5 μM (ver más adelante) + 1 μl Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green 10X + 3 ml de ADNc diluido 1:10 (volumen final 10 ml). La reacción de PCR se realizó en el termociclador LightCycler 1.5 con ayuda del programa LCS4 (Roche) (Ver apéndice IV para detalles de amplificación). La cuantificación relativa del mRNA de los receptores de DA se realizó por el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

7.9 Ensayos de unión de radioligando de un solo punto

Los ensayos fueron llevados a cabo como se describe en Levant (2007). Se utilizaron antagonistas selectivos para los receptores de DA, el $^3\text{[H]}$ SCH 23390 que es selectivo para los receptores D1R, y la $^3\text{[H]}$ spiperona que es selectivo para los receptores D2R. En ambos casos se evaluó la unión a una sola concentración de radioligando, cercana a la K_d reportada (0.2 nM para $^3\text{[H]}$ SCH23390 y 0.15 para $^3\text{[H]}$ spiperona). Se han descrito dos estados de afinidad para los receptores de dopamina D1R y D2R, $^{\text{High}}$ y $^{\text{Low}}$ (Richfield et al., 1989), sin embargo el uso de antagonistas no permite distinguir entre estos estados funcionales. Para evaluar la unión específica de cada radioligando se utilizó (+) butaclamol, que es un antagonista compite por el sitio de unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 con una K_i de 1-5 nM y por el sitio de unión de $^3\text{[H]}$ spiperona con una K_i de 0.5-3 nM.

Para los ensayos de unión del receptor D1R, se ensamblaron por duplicado las siguientes reacciones en un volumen final 500 μ l en buffer D1R: Unión total: 25 μ l de 3 [H] SCH 23390 4 nM (0.2 nM final, Perkin Elmer, 1 mCi/ml, 82.9 Ci/mmol) + membranas resuspendidas en buffer D1R (35-70 μ g). Unión no específica: 25 μ l de 3 [H] SCH 23390 4 nM (0.2 nM final) + 100 μ l (+) butaclamol 5 μ M en buffer D1R (1 μ M final) + membranas (35-70 μ g).

Para los ensayos de unión del receptor D2R, se ensamblaron por duplicado las siguientes reacciones (volumen final 500 μ l en buffer D2R): Unión total: 25 μ l de 3 [H] spiperona 3 nM (0.15 nM final, Perkin Elmer, 1 mCi/ml, 83.7 Ci/mmol) + membranas resuspendidas en buffer D2R (35-70 μ g). Unión no específica: 25 μ l de 3 [H] spiperona 3 nM (0.15 nM final) + 100 μ l (+) butaclamol 5 μ M en buffer D2R (1 μ M final) + membranas (35-70 μ g).

Una vez preparadas las reacciones, se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se añadieron 3 ml de buffer de lavado a 4°C (50 mM Tris, pH 7.4), se filtró cada reacción a través de filtros GF/C (Watman) y se realizaron dos lavados más con 3 ml de buffer de lavado. Los filtros fueron colocados en viales de centelleo, se dejaron secar 30 minutos, y fueron incubados con 5 ml de líquido de centelleo durante una hora a temperatura ambiente. Los valores de CPM (cuentas por minuto) fueron obtenidos con un contador de centelleo (LS 6500, Beckman). Para obtener los valores de unión específica, se restó el promedio de los duplicados de la unión total y unión no específica. Cada experimento por condición fue realizado tres veces.

7.10 Análisis estadístico

Se evaluaron las diferencias de la expresión relativa del mRNA y la proteína, y de la unión a los radioligandos, entre los grupos PBS y AK usando una prueba de Kruskal Wallis, así como una prueba post hoc U de Mann Whitney.

Los efectos de la inyección con PBS o con KA en la actividad locomotora espontánea fueron evaluados usando un análisis de varianza (ANOVA).

8 RESULTADOS

Dado que se han reportado cambios en la expresión de los receptores de DA durante el día (Wirz-Justice, 1987) y en las diferentes fases del ciclo estral (Di Paolo et al., 1988; Hruska et al., 1982; Levesque et al., 1989; Levesque y Di Paolo, 1993), todas las ratas fueron sacrificadas a la misma hora (fase de oscuridad) y se determinó la fase del ciclo estral de las hembras justo antes del sacrificio (Apéndice III).

8.1 Registro de la actividad locomotora espontánea en ratas lesionadas unilateralmente con AK

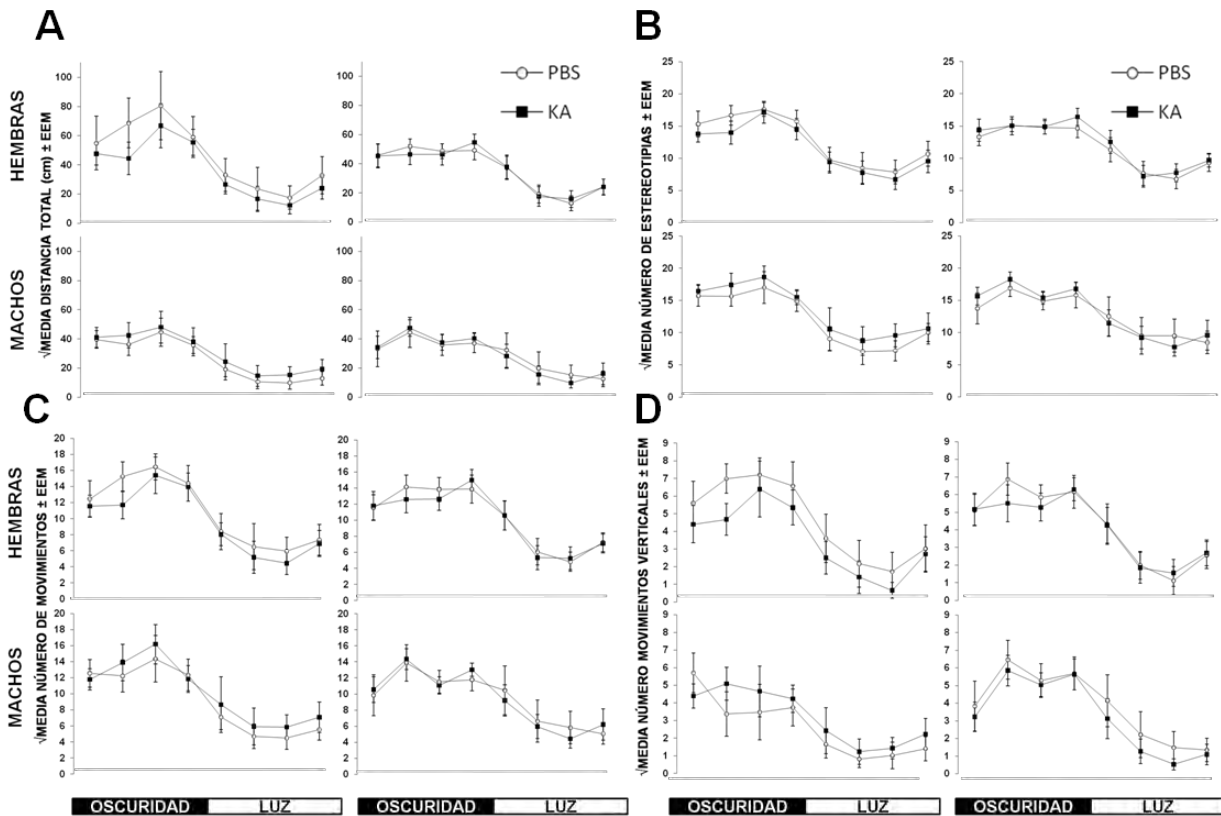


Figura 4. Actividad locomotora espontánea 7 y 30 días después de una inyección con PBS o AK, en ratas hembra y macho.

Se muestra la raíz cuadrada de la actividad promedio de las 24 horas de registro, agrupadas en bloques de 3 horas, así como el error estándar de la media. A, distancia total; B, número de estereotipias; C, número de movimientos; D, número de movimientos verticales, registrados 7 y 30 días después de la lesión con AK (cuadros negros) o inyección con PBS (círculos blancos). n=5 en cada grupo.

En la figura 4 se muestran cuatro de los parámetros de actividad locomotora espontánea analizados: distancia total recorrida (indica la distancia recorrida (cm) por el

sujeto en un tiempo de muestreo determinado), el número de movimientos verticales (número de incorporaciones que el sujeto realiza en un tiempo de muestreo determinado), el número de estereotipias (número de veces que el sistema registra actividad estereotipada), y número de movimientos (número de movimientos horizontales realizados por el sujeto en un tiempo de muestreo determinado).

No se observan cambios después de la lesión con AK con respecto a los animales inyectados con PBS, en ningún género y en ningún tiempo post lesión.

8.2 Caracterización histológica de la lesión inducida por la inyección estriatal unilateral de AK

En las figuras 5 y 6 se muestra la inmunoreacción de NeuN y GFAP en cortes representativos obtenidos 7 y 30 días después de una lesión unilateral con AK. Tanto la disminución en el número de núcleos positivos a NeuN (marcador neuronal) como el aumento de marca GFAP (marcador glial) se presenta únicamente en el lado inyectado con AK (Figuras 5 y 6, B, D y F). El aumento en la expresión de GFAP, el cambio en la morfología y la aparente proliferación de las células gliales observadas en las figuras 5D y 6F son indicadores de glía reactiva (Sofroniew y Vinters, 2010). En el caso de las ratas inyectadas con PBS, no se observa disminución de la marca NeuN ni en el estriado inyectado ni en el contralateral a la inyección (no mostrado). Sin embargo, la lesión mecánica produjo gliosis, limitada al sitio de la inyección y mucho menos generalizada que la gliosis observada en el grupo inyectado con AK mostrado en las figuras 5D y 6F.

La muerte neuronal reflejada como disminución de la marca de NeuN, es más evidente 30 días después de la lesión (Figura 6), comparado con la muerte observada a los 7 días post lesión (Figura 5). Estos datos concuerdan con los mostrados en el apéndice I, en donde se observó mayor disminución de la actividad de la enzima citocromo oxidasa 30 días después de la lesión (Figura 15). Sin embargo la reacción glial 7 días después de la lesión es más generalizada comparada con la reacción observada 30 días post lesión, que se encuentra limitada al sitio de lesión (ver figuras 5D y 6F).

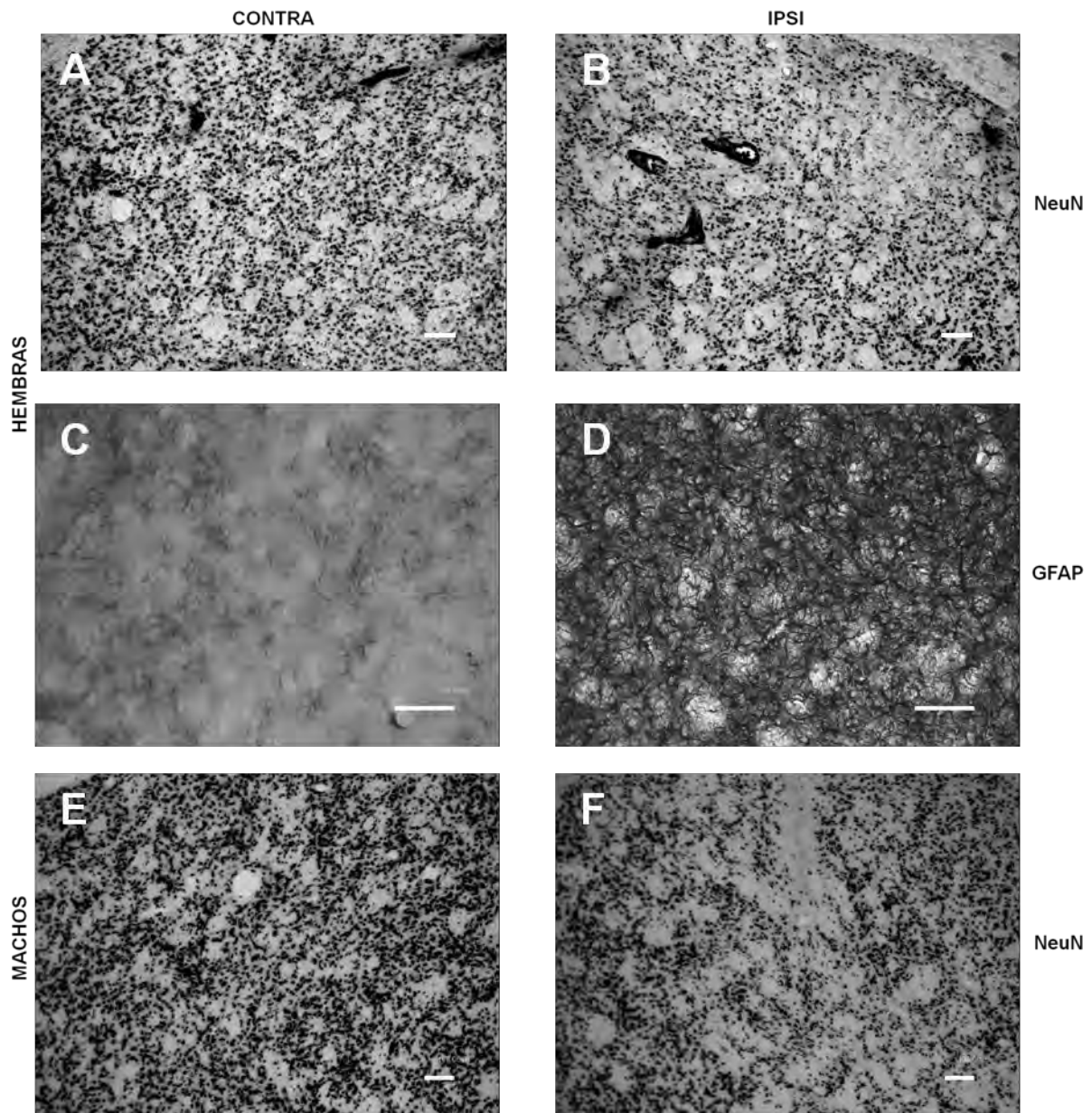


Figura 5. Caracterización histológica de la lesión estriatal 7 días después de la inyección unilateral con AK.

Inmunohistoquímica de NeuN y GFAP 7 días después de la lesión con AK en ratas hembra (A-D) y macho (E-F). Se muestra tanto el lado no inyectado (CONTRA, A, C y D) como inyectado con AK (IPSI, B, D y F). A, B, E y F, NeuN; C y D, GFAP. Las barras representan 100 μm .

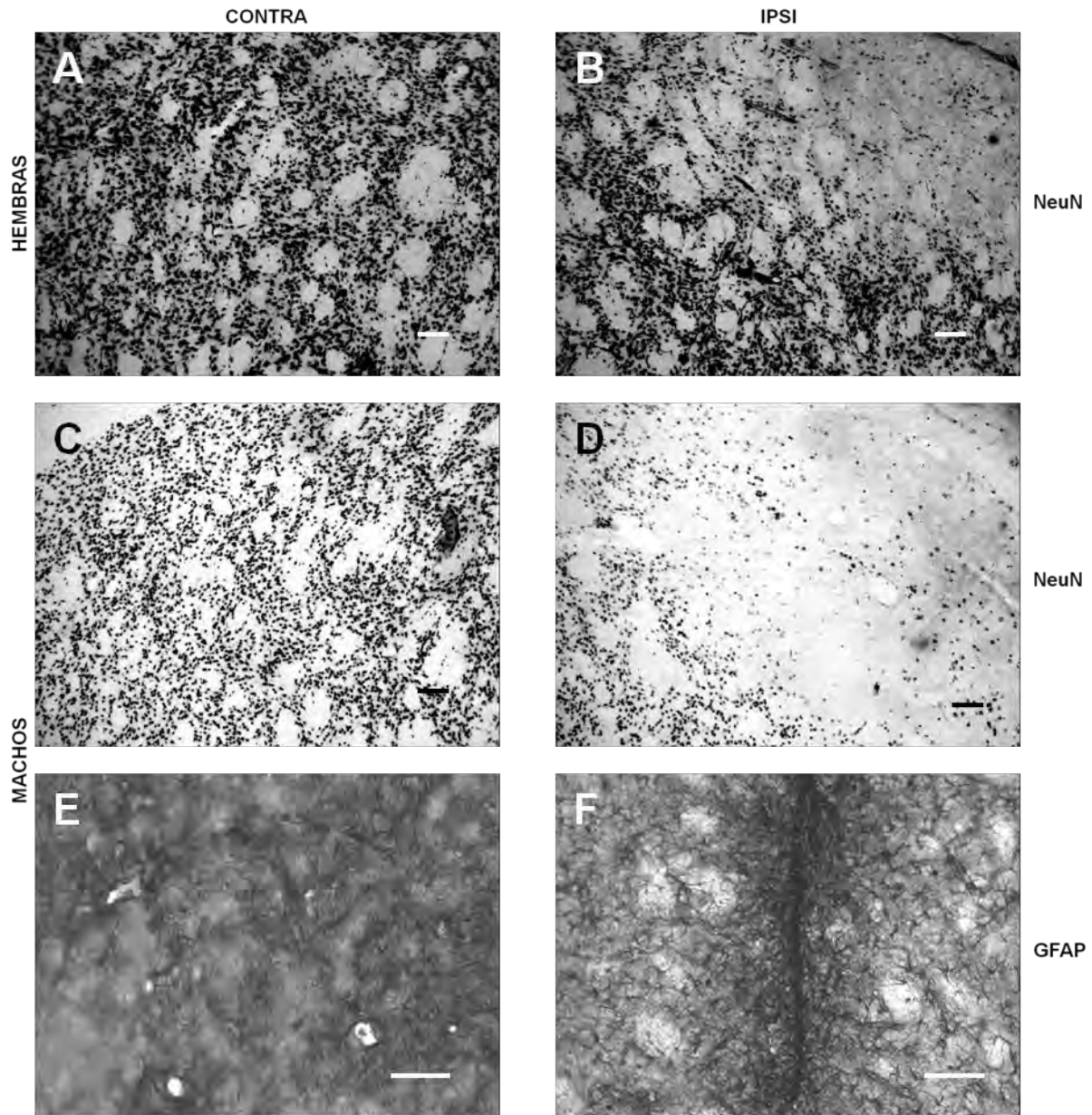


Figura 6. Caracterización histológica de la lesión estriatal 30 días después de la inyección unilateral con AK.

Inmunohistoquímica de NeuN y GFAP 30 días después de la lesión con AK en ratas hembra (A y B) y macho (C-F). Se muestra tanto el lado no inyectado (CONTRA, A, C y E) como el inyectado (IPSI, B, D y F). A-D, NeuN; E y F, GFAP. Las barras representan 100 μ m.

8.3 Ensayos de unión a radioligando de un solo punto

8.3.1 Unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 a membranas estriatales

En la figura 7 se representan la medias y error estándar del porcentaje de diferencia de unión de $0.2 \text{ nM } ^3\text{[H]} \text{SCH23390}$ a membranas estriatales de los grupos inyectados AK, con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figura 16), en donde se muestran los datos crudos de los ensayos. Dado se utilizó una sola concentración de $^3\text{[H]} \text{SCH 23390}$ como aproximación inicial, los valores obtenidos no permiten distinguir entre cambios en la densidad de receptores (B_{max}) y cambios en su afinidad (K_d).

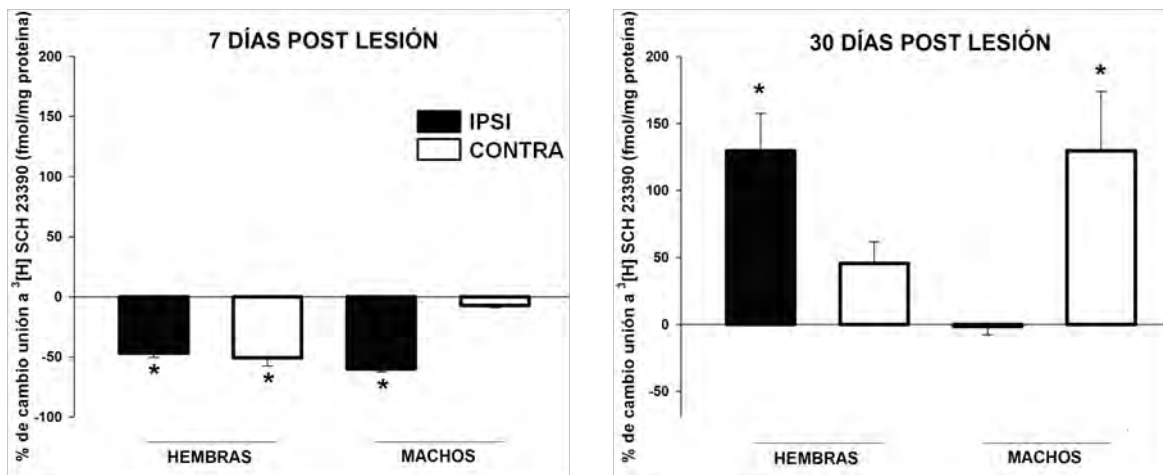


Figura 7. Porcentaje de cambio de la unión a $0.2 \text{ nM } ^3\text{[H]} \text{SCH 23390}$ a membranas estriatales después de una inyección unilateral con AK.

Se representa el % de cambio (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. Valores representativos de 3 ensayos a partir de un pool de membranas estriatales de 5 animales por condición PBS y de 3 por condición AK.* Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

Siete días post lesión se observó una disminución (~50%) de la unión de $^3\text{[H]} \text{SCH 23390}$ en todos los grupos AK, excepto el lado contralateral a la lesión en machos (Figura 7). Treinta días post lesión se observó un aumento del ~130% en el lado inyectado en hembras y en el contralateral en machos. Aunque la diferencia entre el grupo de hembras contralateral AK y su control no fue estadísticamente significativa, el

aumento del ~45% en el valor de unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 podría tener relevancia fisiológica.

8.3.2 Unión de $^3\text{[H]}$ spiperona a membranas estriatales

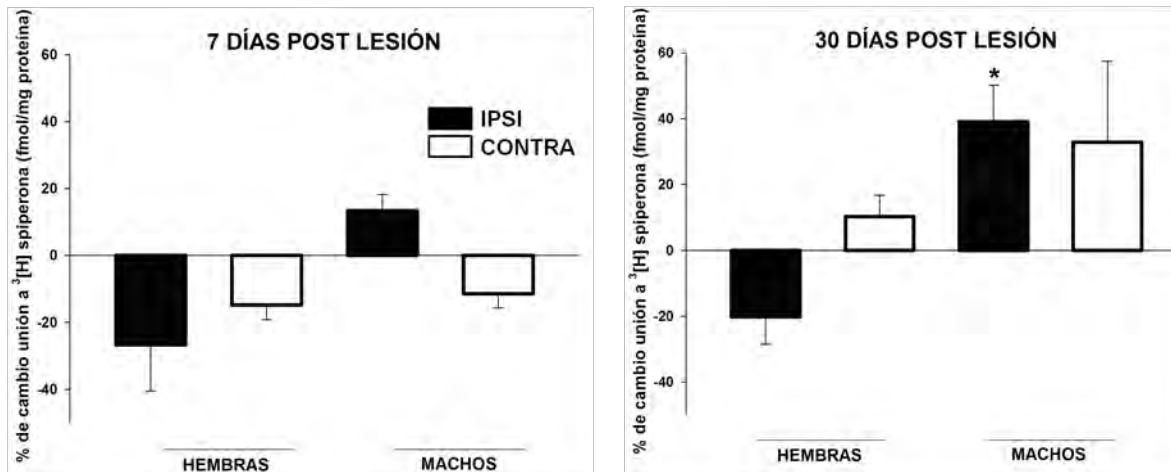


Figura 8. Porcentaje de cambio de la unión a 0.15 nM de $^3\text{[H]}$ spiperona a membranas estriatales después de una inyección unilateral con AK.

Se representa el % de cambio (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. Datos representativos de 3 ensayos a partir de un pool de membranas estriatales de 5 animales por condición PBS y de 3 por condición AK. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

En la figura 8 se representan la medias y error estándar del porcentaje de diferencia de unión de 0.15 nM $^3\text{[H]}$ spiperona, de los grupos inyectados AK con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figura 17), en donde se muestran los datos crudos de los ensayos.

Siete días después de la lesión no se observaron cambios significativos en la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona. Únicamente aumentó significativamente este valor (~40%, lado inyectado) 30 días post lesión en machos.

8.4 Evaluación por Western blot de la abundancia relativa de la proteína de los receptores de

8.4.1 Abundancia relativa de la proteína de D1R

El anticuerpo anti D1R utilizado en este estudio reconoce bandas de diferentes pesos moleculares (~80, ~70, ~49, y 2 diferentes entre ~49 y ~37 KDa). Se analizó la

expresión relativa de dos de ellas, la de ~49 KDa (que fue detectada más abundantemente y que corresponde al peso predicho de la estructura primaria de D1R) y la de ~70 KDa (que también ha sido reportada como D1R en estriado de rata (Gingrich et al., 1992; Hersch et al., 1995; Levey et al., 1993) y que puede corresponder a la forma glicosilada de esta proteína (Jarvie et al., 1989).

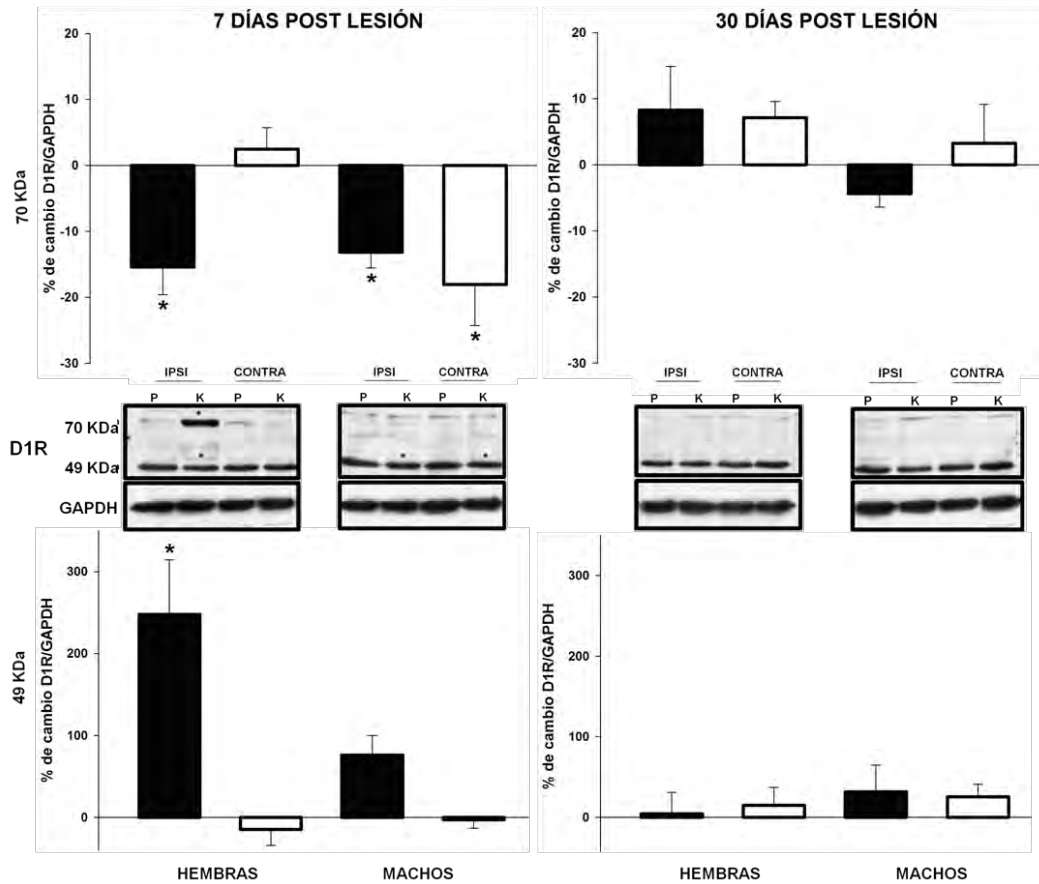


Figura 9. Porcentaje de cambio de la expresión relativa de la proteína D1R (~49 KDa y ~70 KDa) después de una inyección unilateral con AK.

Se representa el % de cambio (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. P, PBS; K, AK. Datos representativos de 3 blots a partir de un pool de proteínas estriatales de 5 animales por condición PBS y de 3 por condición AK. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

La figura 9 muestra la abundancia relativa de la proteína D1R con respecto a la expresión de GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), evaluada por Western

blot. La abundancia de GAPDH no cambia después de la inyección con AK (no mostrado).

Con fines ilustrativos, se representan las medias y error estándar del porcentaje de diferencia de los grupos AK con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figuras 18A y B), en donde se muestran los datos crudos de la relación D1R/GAPDH.

Siete días después de la lesión se observa una disminución (~15%) de D1R ~49KDa en todas las condiciones, excepto en el lado contralateral a la inyección en hembras. Treinta días post lesión no se observan cambios. Únicamente se observaron diferencias (aumento ~240%) en la isoforma D1R de ~70 KDa en el lado inyectado en hembras, 7 días post lesión.

8.4.2 Abundancia relativa de la proteína de D2R

El anticuerpo anti D2R utilizado en este estudio reconoce tanto D2R_S como D2R_L y se detectó una sola banda de ~64.2 KDa que corresponde a la forma glicosilada de ambas isoformas (Fishburn et al., 1995).

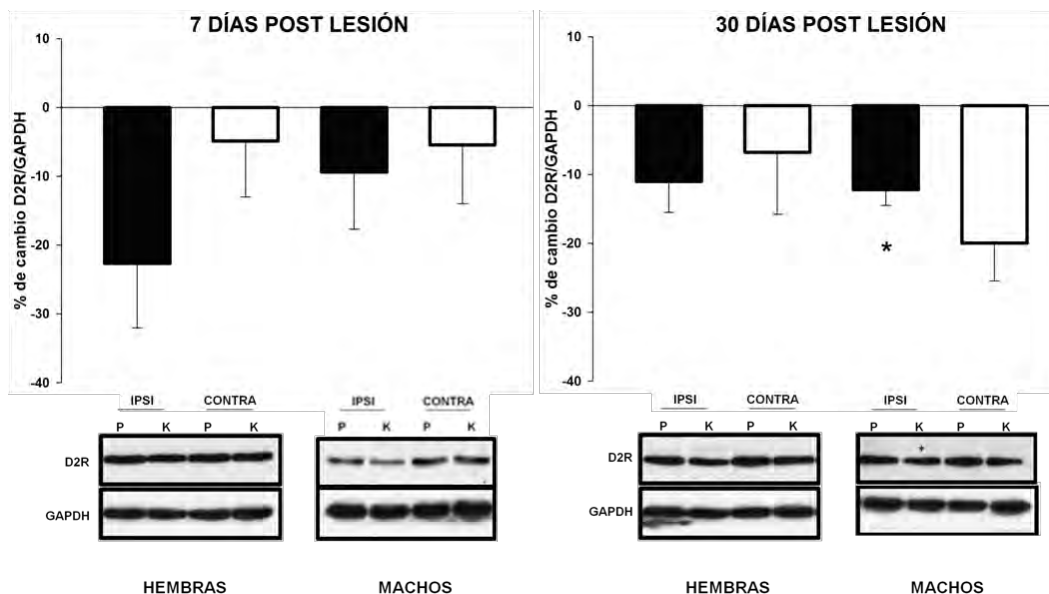


Figura 10. Porcentaje de cambio de la expresión relativa de la proteína D2R_S y L después de una inyección unilateral con AK.

Se representa el % de cambio (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. P, PBS; K, AK. Datos representativos de 3 blots a partir de un pool de proteínas estriatales de 5 animales

por condición PBS y de 3 por condición AK. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

En la figura 10 se muestra la expresión de las dos isoformas del receptor D2R relativo a la expresión de GAPDH en el estriado de ratas hembras y macho, 7 y 30 días después de la inyección con AK. Con fines ilustrativos, se representan las medias y error estándar del porcentaje de diferencia de los grupos AK con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figura 19), en donde se muestran los datos crudos de la relación D2R/GAPDH.

Únicamente se observó una disminución significativa en la abundancia de D2R en machos (lado inyectado, ~10%) 30 días después de la lesión. Sin embargo, se observa una tendencia general a disminuir después de la inyección con AK, que puede ser relevante a pesar de no ser estadísticamente significativa.

8.5 Evaluación por PCR tiempo real de la abundancia del mRNA de los receptores de DA

8.5.1 Abundancia relativa del mRNA de D1R

En la figura 11 se muestra la abundancia relativa del mRNA de D1R después de una inyección unilateral con AK. Con fines ilustrativos, se representan las medias y error estándar del porcentaje de diferencia de los grupos AK con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figura 20), en donde se muestran los datos crudos de la abundancia del mRNA de D1R relativa a la abundancia del mRNA de β actina. Esta última no cambia después de la inyección con AK (no mostrado).

Siete días post lesión, la abundancia del mRNA de D1R disminuyó en el lado inyectado ~5% en hembras y aumentó en machos (lado contralateral a la inyección ~20%). Treinta días post lesión los cambios se observaron únicamente en hembras (disminución ~20% lado inyectado, ~5% estriado contralateral). Es posible que la diferencia del ~5% observada en hembras 7 y 30 días post lesión (IPSI y CONTRA, respectivamente) sean estadísticamente significativas debido a la pequeña variación experimental, sin embargo pueden no representar una diferencia fisiológica.

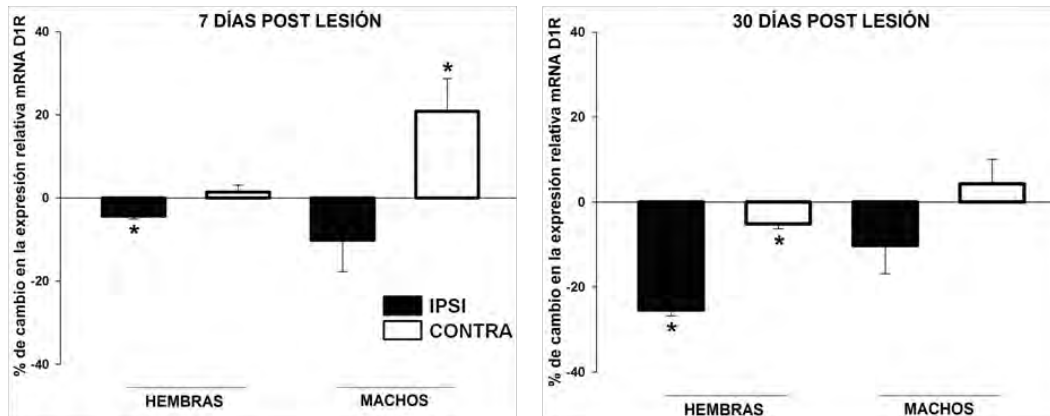


Figura 11. Porcentaje de cambio de la expresión relativa del mRNA de D1R después de una inyección unilateral con AK.

Se representa el % de cambio (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. Datos representativos de 3 repeticiones a partir de un pool de ARN estriatal de 5 animales por condición. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

Es de esperarse que los cambios evaluados en la abundancia relativa del mRNA de los receptores de DA no siempre sean reflejados en cambios en la abundancia de la proteína. Sin embargo, esta medida puede sugerir cambios en la estabilidad del mRNA, cambios en su degradación, o cambios en su tasa de transcripción o traducción.

8.5.2 Abundancia relativa del mRNA de D2R

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio no amplifican la isoforma D2R_S, por lo que únicamente se evalúa la isoforma presente en las NME (Lindgren et al., 2003). En la figura 12 se muestra la abundancia relativa del mRNA del receptor de dopamina D2R_L después de una inyección unilateral con AK. Con fines ilustrativos, se representan las medias y error estándar del porcentaje de diferencia de los grupos AK con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figura 21), en donde se muestran los datos crudos de la abundancia del mRNA de D2R relativa a la abundancia del mRNA de β actina.

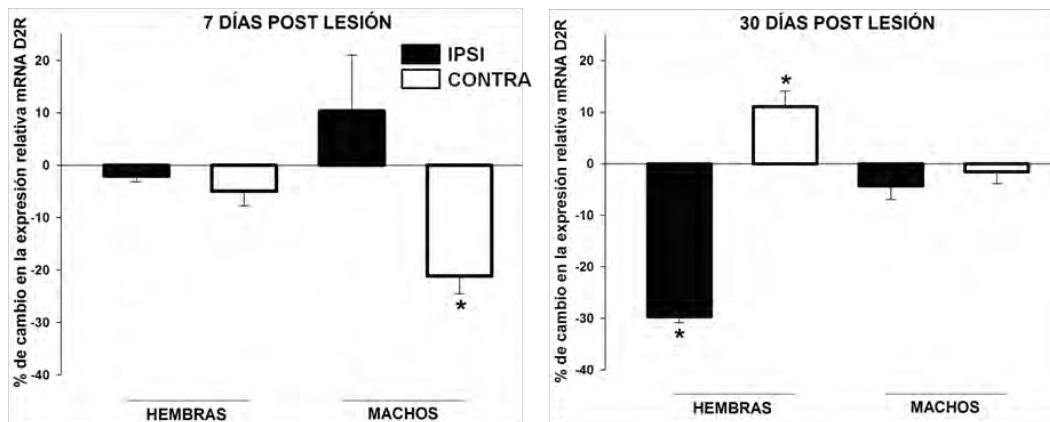


Figura 12. Porcentaje de cambio de la expresión relativa del mRNA de D2R_L después de una inyección unilateral con AK.

Se representa el % de cambio (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. Datos representativos de 3 repeticiones, a partir de un pool de ARN estriatal de 5 animales por condición.* Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

Siete días post lesión, la abundancia relativa del mRNA de D2R disminuyó únicamente en machos (contralateral, ~20%). Sin embargo 30 días post lesión los cambios sólo fueron significativos en hembras (disminución del ~30% en el lado inyectado, aumento del ~10% en el lado contralateral).

8.6 Evaluación de la fosforilación de Thr⁷⁵ de DARPP32

En la figura 13 se muestra la fosforilación de DARPP32 en la Thr⁷⁵ después de una lesión unilateral con AK. Se representan las medias y error estándar del porcentaje de diferencia de los grupos AK con respecto a su control. El análisis estadístico fue realizado con los valores mostrados en el apéndice II (Figura 22), en donde se muestran los datos crudos de la relación fosfoThr⁷⁵/DARPP32.

Se observó una disminución del ~20% en el lado contralateral a los 7 días post lesión, y aumento del ~20% en el lado inyectado 30 días post lesión. No se observaron cambios en machos.

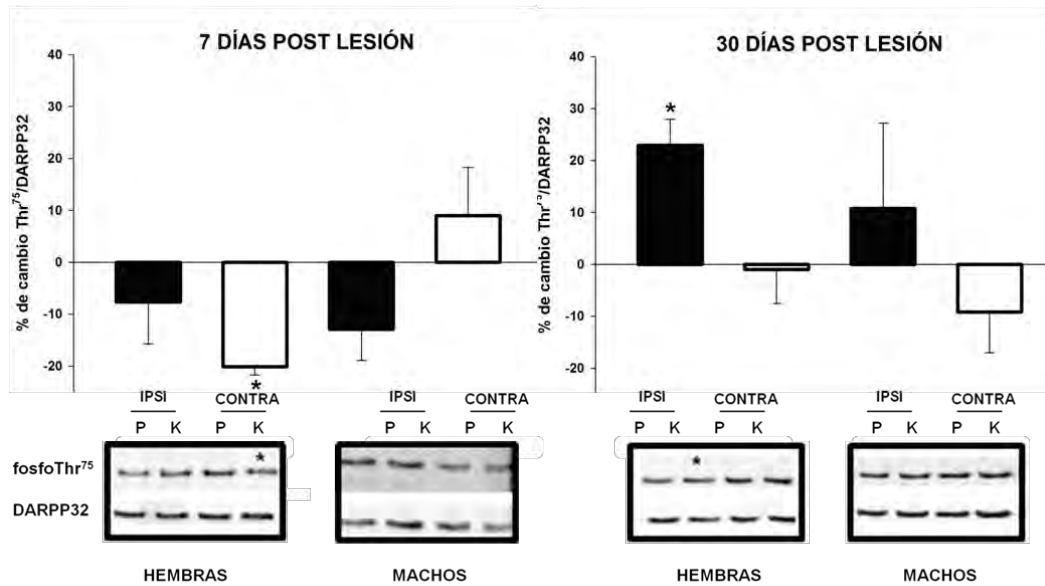


Figura 13. Porcentaje de cambio de la fosforilación Thr⁷⁵ de DARPP32 en el estriado después de una lesión unilateral con AK.

Se representa el % de cambio de la relación fosfoThr⁷⁵/DARPP32 (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. P, PBS; K, AK. Datos representativos de 4 repeticiones a partir de un pool del estriado de 5 animales por condición.* Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

8.1 Evaluación del estado de fosforilación de las ERK1/2

En la figura 14 se muestra la tasa de fosforilación (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) de las ERK1/2 evaluada por Western blot, 7 y 30 días de la inyección con PBS o AK en el estriado lesionado de ratas macho y hembra. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de fosforilación de estas MAPK después de una lesión con AK. A pesar de la variabilidad entre datos, se observa una tendencia a disminuir la fosforilación de las ERK1/2 después de la inyección con AK, tanto en el estriado inyectado como en el estriado contralateral.

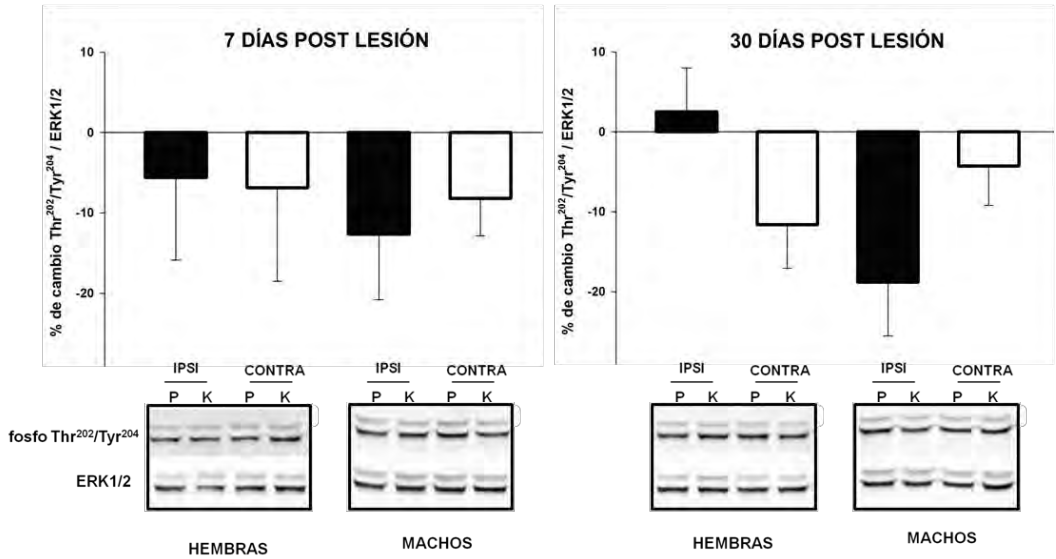


Figura 14. Porcentaje de cambio de la fosforilación de las ERK 1/2 en el estriado después de una lesión unilateral con AK.

Se representa el % de cambio de la relación fosfo Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ / ERK1/2 (media y error estándar de la media) de los grupos inyectados con AK con respecto a su control (PBS). IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. P, PBS; K, AK. Datos representativos de 4 repeticiones a partir de un pool del estriado de 5 animales por condición.* Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

9 DISCUSIÓN

9.1 *Actividad locomotora espontánea y muerte neuronal en el estriado después de una lesión unilateral con AK*

Como es de esperarse después de una lesión unilateral con AK, no se observaron diferencias en la actividad locomotora espontánea entre los grupos inyectados con AK y el grupo control (PBS), a ninguno de los tiempos post lesión evaluados, ni en ninguno de los géneros (Figura 4). Este fenómeno ha sido reportado en otros trabajos (Andersson et al., 1980; Klug y Norman, 1993; Schwarcz et al., 1979) en donde se describe la inducción de una conducta de giro únicamente después de la administración de apomorfina, un agonista no selectivo de los receptores de DA. Durante el registro de la actividad locomotora espontánea se observó el patrón típico de actividad en roedores, es decir un aumento en la actividad durante la fase oscura y un decremento en la fase de luz. Esto indica que la administración unilateral de AK no interfiere con el ciclo sueño-vigilia de las ratas.

La ausencia de cambios en la actividad locomotora espontánea en lesiones unilaterales con AK, usando dosis similares a las que inducen hiperactividad en lesiones bilaterales (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001), sugiere que el estriado contralateral podría llevar a cabo cambios compensatorios, que aun no se han descrito con precisión (Andersson et al., 1980; Schwarcz et al., 1980). Sin embargo estudiar el origen y la regulación de los mecanismos de compensación es importante para entender los desórdenes de movimiento asociados al estriado en el humano. Por ello, en el presente trabajo se evaluaron los cambios en los receptores de DA tanto en el lado inyectado con AK como en el estriado contralateral.

La inyección con AK produce muerte neuronal en el lado inyectado, por lo que se puede esperar una disminución en los receptores de DA, como se ha descrito por Weinreich y Seeman (1980). En un modelo de la enfermedad de Huntington usando ratas transgénicas se han encontrado diferencias de género en términos de muerte de las NME, siendo los machos más vulnerables a perder de estas células (Bode et al., 2008), además de presentar más alteraciones conductuales. Estas evidencias apoyan la

hipótesis de que los cambios en los receptores de dopamina después de la muerte de las NME dependen del género. Aunque por estudios *in vitro* se espera mayor vulnerabilidad a la muerte por AK de las NME estriato palidales (Mesco et al., 1992), para saber qué población neuronal es más vulnerable en nuestro modelo sería conveniente realizar inmunohistoquímica de D1R y de D2R o lesionar ratones transgénicos BAC que expresan GFP bajo el promotor de D1R o D2R (Valjent et al., 2009).

Las inyecciones estriatales de 5 nmol de AK producen una lesión localizada en la región dorsal del estriado, en la que se puede apreciar muerte neuronal, medida indirectamente por la disminución de NeuN (Figuras 5 y 6) y por disminución en la actividad de citocromo oxidasa (Apéndice I, figura 15), tanto 7 como 30 días después de la lesión en ambos géneros. Esto confirma lo observado en otros estudios utilizando diferentes marcadores y donde se describe tanto pérdida de las NME como de neuronas colinérgicas (Chen et al., 1996; Nakai et al., 2000; Zaczek et al., 1978). Además se observa la presencia de glía reactiva (aumento en GFAP, aparente proliferación, cambio de morfología) en toda la región de la lesión, mientras que la lesión mecánica en los controles inyectados con PBS induce poca gliosis, limitada al sitio de la inyección (no mostrado). Aunque en este estudio no se evalúa directamente la participación de la glía después de la lesión con AK, es importante tomarla en cuenta para la interpretación de los resultados ya que no se puede descartar su importante papel en la evolución del daño estriatal, como se ha descrito antes (Sofroniew y Vinters, 2010).

9.2 *Receptores de dopamina*

Aunque no es parte de los objetivos de este trabajo, se evaluaron las diferencias entre los grupos IPSI y CONTRA PBS. Esta comparación puede reflejar el efecto de la lesión mecánica o las diferencias inter hemisféricas basales, que ya han sido descritas (Drew et al., 1986; Glick et al., 1988; Schneider et al., 1982). En los ensayos de unión de $^3\text{[H]}$ SCH23390 (Apéndice II, figura 16) se observó que en hembras este valor es menor (~50%) en el estriado inyectado (derecho) que en el izquierdo. Esta asimetría no se observa en la abundancia de la proteína (Apéndice II, figura 18A y B), y el mRNA de

D1R es ligeramente más abundante en el lado derecho (aunque el valor es muy pequeño y puede reflejar poca variabilidad experimental, Apéndice II, figura 20). En el caso de los machos, la unión de $^3\text{[H]}$ SCH23390 es menor en el lado izquierdo únicamente 7 días después de la inyección (Apéndice II, figura 16), lo cual concuerda con las diferencias en la abundancia de la proteína de D1R 49 KDa (Apéndice II, figura 18).

No se observaron diferencias inter hemisféricas en la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona (Apéndice II, figura 17). Esto concuerda con la abundancia de la proteína de D2R, excepto para hembras 7 días después de la inyección, en donde se observa menor abundancia en el estriado derecho (Apéndice II, figura 19). La abundancia del mRNA de D2R es mayor en el estriado izquierdo 7 días después de la inyección, en ambos géneros (Apéndice II, figura 21). Esta diferencia se mantiene en machos 30 días post lesión. Sin embargo, en hembras el mRNA de D2R es más abundante en el estriado derecho 30 días post lesión. Se han descrito diferencias inter hemisféricas en la B_{max} de los receptores D2R tanto en hembras como en machos (Drew et al., 1986; Glick et al., 1988; Schneider et al., 1982). No podemos comparar los valores obtenidos en este estudio con los de otros trabajos puesto que no evaluamos el estriado intacto y no podemos descartar la participación de la lesión mecánica en los datos obtenidos, además de que nuestros datos de unión a radioligando no son valores de B_{max} . No se observaron cambios inter hemisféricos en la fosforilación basal de DARPP32 y de las ERK1/2 (Apéndice II, figuras 22 y 23).

9.2.1 D1R

Comparado con el grupo control, siete días post lesión se observó una disminución en la unión de $^3\text{[H]}$ SCH2330 en el estriado inyectado con AK, tanto en hembras como en machos (Figura 7). Esta disminución puede no estar asociada únicamente a la pérdida de las neuronas que expresan D1R, pues la unión a este radioligando en hembras también disminuye en el lado contralateral a la inyección con AK, donde no se ha reportado muerte neuronal ni gliosis (Figuras 5 y 6, CONTRA) (Andersson et al., 1980). La disminución bilateral de este valor es exclusivo de las hembras, lo cual podría en parte explicar cómo en un modelo de lesión bilateral con AK, 7 días post lesión los

machos son notablemente más hiperactivos que las hembras (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001).

La proteína de D1R (49 KDa) 7 días post lesión también disminuye en ambos géneros, sin embargo, disminuye con un patrón opuesto al observado en la unión de $^3\text{[H]}$ SCH2330, disminuyendo únicamente en el estriado inyectado en las hembras y bilateralmente en los machos (Figura 9). La proteína de D1R de 70 KDa aumenta 7 días post lesión en el estriado inyectado con AK. Este aumento es mucho mayor en hembras que en machos y no se presenta a los 30 días post lesión. Este cambio no se ve reflejado en el valor de unión de $^3\text{[H]}$ SCH2330 y no va acompañado de aumento en la abundancia del mRNA, pues 7 días post lesión el único cambio en la abundancia del mRNA de este receptor es un aumento en el estriado contralateral en machos.

Treinta días después de la lesión con AK, en las hembras se observa un aumento bilateral en la unión de $^3\text{[H]}$ SCH2330; mientras que en los machos este aumento únicamente se observó en el estriado contralateral (Figura 7). Estos aumentos son mayores al 100% en el caso de hembras IPSI y machos CONTRA, y no se traducen en aumentos en la abundancia de la proteína de D1R, por lo que podría significar un cambio en la afinidad de estos receptores, como se ha descrito para los receptores de GABA en este modelo (Campochiaro et al., 1977). Treinta días post lesión la abundancia del mRNA de D1R disminuye bilateralmente en hembras, mientras que en machos no se observaron cambios.

La evaluación de la unión a radioligandos en membranas totales y de la abundancia relativa de la proteína de D1R y D2R en homogenados totales de estriado, puede ser un indicador indirecto de cambios en la traducción de estas proteínas, pero no permite saber si los receptores se encuentran en la membrana plasmática o si son funcionales.

9.2.2 D2R

Se observaron pocos cambios estadísticamente significativos en los parámetros de D2R evaluados. En lesiones en la SNc con 6-OHDA y en modelos genéticos de enfermedad de Huntington, se han encontrado más cambios estriatales en los

receptores D1R y/o en su vía de señalización (Bibb et al., 2000; Brown et al., 2005; Gerfen et al., 2002; Ungerstedt, 1971).

Siete días post lesión se observó una disminución del ~20% en la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona y en la abundancia de la proteína de D2R en el estriado inyectado con AK en hembras. Estos cambios no son estadísticamente significativos pero podrían ser parte de la diferencia de género en la hiperactividad mostrada 7 días después de una lesión bilateral con AK (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001). El único cambio observado en la abundancia del mRNA de D2R 7 días post lesión es una disminución en el estriado contralateral en machos. Treinta días post lesión en hembras se observa una tendencia a disminuir en el estriado inyectado tanto la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona como la abundancia de la proteína de D2R, además de observarse una disminución significativa en la abundancia de su mRNA. En machos 30 días post lesión se observa un aumento bilateral en la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona (aunque el aumento en el estriado contralateral no es estadísticamente significativo) que podría significar un aumento en la afinidad de los receptores D2R, ya que la abundancia de su proteína disminuye bilateralmente, y no se observan cambios en la abundancia de su mRNA. Sin embargo, estos resultados son diferentes a los reportados por Weinreich y Seeman (1980), quienes observaron una disminución del 55% en la B_{max} de estos receptores 27 días después de una lesión unilateral con AK, sin observar cambios en su afinidad.

9.3 Cambios en la vía de señalización de los receptores de DA

En el presente estudio se analizó el estado basal de la fosforilación de dos proteínas clave para la señalización en las NME, las ERK1/2 y la DARPP32. Se ha sugerido que estas proteínas participan en la integración de las señales glutamatérgicas y dopaminérgicas en el estriado (Lindskog et al., 2006; Valjent et al., 2005), además de que sus alteraciones se han visto implicadas en los cambios estriatales después de una lesión en modelos animales (Cai et al., 2000; Gerfen et al., 2002). Las diferencias encontradas en la fosforilación de la Thr⁷⁵ de DARPP32 fueron dependientes del tiempo, del género y del lado (lesionado vs. contralateral a la lesión). Estos cambios sólo fueron observados en hembras, donde 7 días post lesión la fosforilación de esta proteína disminuyó en el estriado contralateral, y 30 días post lesión aumentó en el

estriado inyectado con AK (Figura 13). La fosforilación de este sitio en DARPP32 está relacionada con la actividad de D2R. Esto sugiere que en hembras 7 días después de la lesión disminuye la actividad de D2R en el lado contralateral, pero que 30 días después esta actividad aumenta en el lado lesionado. Aunque 7 días post lesión no se observaron cambios en los receptores D2R en el estriado contralateral, 30 días post lesión se observó una tendencia a disminuir la abundancia de este receptor en el estriado inyectado con AK. Al no evaluar la fosforilación de DARPP en respuesta a un agonista dopaminérgico, no sabemos si los cambios observados dependen de la señalización mediada por los receptores de DA.

No se observaron cambios en la fosforilación basal de las ERK1/2 (Figura 14). Al igual que en el caso de DARPP32, al no evaluar esta fosforilación en respuesta a un agonista dopaminérgico, no sabemos si ésta depende de la señalización mediada por receptores de DA, ya que estas cinasas son activadas por una gran cantidad de estímulos (Shaul y Seger, 2007).

Se ha reportado que en el estriado ventral la abundancia basal de DARPP32 y de la fosforilación de Thr³⁴ es mayor en hembras, y que después de la administración de cocaína es mayor en machos (Zhou et al., 2009). Sin embargo aun faltan estudios que evalúen las diferencias de género a nivel de la señalización mediada por receptores de DA. En un modelo de la enfermedad de Parkinson se observaron cambios en la fosforilación basal de la Thr⁷⁵ de DARPP32 (Brown et al., 2005), lo cual sugiere que los cambios en las NME después de una lesión y/o patología pueden reflejarse en cambios basales en las vías de señalización. Sin embargo, como se ha sugerido en otros trabajos, es posible que los cambios en las vías de señalización de los receptores de DA (ERK1/2 y Thr³⁴DARPP32) sean evidentes únicamente después de un reto farmacológico (Gerfen et al., 2002).

9.4 Heterogeneidad celular y relevancia funcional

Es importante señalar que los experimentos realizados para evaluar cambios en los receptores de dopamina y en su señalización tienen como limitante que examinan una población heterogénea de células, por lo que los cambios observados representan un

promedio de los eventos en el estriado. Los inconvenientes de estudiar fenómenos de señalización sin separar las dos poblaciones de NME ha sido abordado en un estudio de Bateup et al., (2008). En este estudio observaron que los cambios en la fosforilación de DARPP32 en respuesta a antipsicóticos y psicoestimulantes son diferentes en ambas poblaciones de NME. Por esta razón, probablemente los pequeños cambios observados en el presente trabajo representan grandes eventos a nivel poblacional en el estriado. Tomando en cuenta que en el modelo de excitotoxicidad por AK además hay muerte neuronal y aumento de glía reactiva, es posible que incluso la ausencia de cambios después de la inyección con AK con respecto a los controles PBS signifique algún cambio compensatorio en las NME que no fue posible evaluar. Es importante señalar que la remodelación estriatal después de un daño muy probablemente no sea exclusiva de los receptores de dopamina, por lo que sería interesante evaluar los cambios en otros receptores. Los receptores de glutamato serían buenos candidatos ya que funcionalmente están íntimamente relacionados con los receptores de DA en las NME (Valjent et al., 2005; Fasano et al., 2009).

Varios estudios han evaluado los efectos de una lesión unilateral con excitotoxinas usando como control el lado contralateral a la inyección (Cosi et al., 2004; Ferrer et al., 2001; Nakai et al., 2000). Sin embargo en el presente estudio, se sugiere que después de una lesión unilateral también puede haber cambios en el lado no inyectado, por lo que al usar éste como control se pierde información acerca de la plasticidad del sistema.

Con respecto a la participación de la glía en los cambios observados, Severson et al., (1983) reportaron que en el estriado no lesionado, el 10% de los sitios de unión de $^3\text{[H]}$ spiperona corresponde a la glía. Es importante considerar este dato al evaluar la unión a este radioligando en el estriado inyectado con AK, donde se observa gliosis, ya que posiblemente no se observaron cambios (Figura 8) por que la glía reactiva “compensa” la pérdida de estos sitios debida a la muerte neuronal. Aunque se ha descrito que las células gliales en cultivo y líneas celulares expresan receptores de dopamina (Bal et al., 1994; Miyazaki et al., 2004; Zanassi et al., 1999), su expresión no se ha reportado en el estriado *in vivo*, por lo que no podemos descartar la participación de la glía en los

cambios observados en este estudio. Es importante considerar esto ya que en la enfermedad de Huntington y de Parkinson también se ha descrito presencia de glía reactiva (McGeer y McGeer, 2008; Sapp et al., 2001).

Se ha descrito que los estrógenos regulan la expresión de ambos receptores de DA (Di Paolo et al., 1988; Hruska et al., 1982; Levesque et al., 1989; Levesque y Di Paolo, 1993), lo cual debe tomarse en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos en hembras, pues como se observa en el apéndice III, las ratas hembra utilizadas en este estudio se encontraban en diferentes fases del ciclo estral. La regulación por estrógenos podría explicar las diferencias observadas en los receptores de DA en respuesta a la inyección con AK entre hembras y machos. Estas observaciones son relevantes ya que, aunque los mecanismos aun son desconocidos, se ha observado que los estrógenos tienen un papel protector en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas estriatales, como la enfermedad de Parkinson y Huntington (Bode et al., 2008; Bourque et al., 2009; Foroud et al., 1999; Roos et al., 1991). Tomando como referencia las alteraciones conductuales observadas en lesiones estriatales bilaterales con AK (Giordano y Mejia-Viggiano, 2001), es posible que los eventos observados en el estriado de ratas hembra sean los más eficientes para restablecer el funcionamiento estriatal después de una lesión. A pesar de que podría esperarse que la expresión estriatal de los receptores de DA fuera similar entre hembras y machos al desaparecer las alteraciones conductuales (30 días post lesión en lesiones bilaterales), nuestros resultados apoyan la existencia de diferencias de género en el funcionamiento basal del estriado (Becker, 1999).

Además de las diferencias entre hembras y machos mencionadas, los cambios no son iguales a los siete o a los treinta días después de la lesión. Es difícil determinar en qué sentido son estos cambios puesto que no son lineales, pero sugieren que la respuesta a la lesión es continua y dinámica. Los eventos observados 30 días post lesión en ambos géneros, cuando en lesiones bilaterales ya no se observa hiperactividad espontánea, pueden representar los cambios a largo plazo necesarios para mantener el funcionamiento del estriado. Sin embargo no contamos con evidencia conductual que lo confirme, por lo que sería necesario inducir conducta de giro (con apomorfina, por

ejemplo (Norman et al., 1992)) para poder interpretar en este sentido nuestros resultados.

Nuestros resultados sugieren que los receptores de DA podrían participar en la remodelación estriatal después de una lesión a diferentes niveles: transcripción, traducción (¿afinidad?), y señalización. Esto permite una amplia gama de respuestas adaptativas para mantener la función dopaminérgica en el estriado. No conocemos la naturaleza de las células que participan en los eventos observados, pero debe destacarse la posible participación de la glía reactiva. Aunque la remodelación estriatal después de una lesión era esperada en el lado inyectado, en donde se observa muerte neuronal y gliosis, también observamos cambios en el lado no inyectado en respuesta a la lesión. Estos cambios, al no ser iguales que en el lado inyectado, podrían corresponder a eventos que no dependen de la muerte celular, lo cual ha sido descrito en respuesta a la inyección unilateral de AK en el hipocampo (Duveau y Fritschy; Yasuda et al., 2001).

10 CONCLUSIONES

Las lesiones estriatales unilaterales con AK no inducen cambios en la actividad locomotora espontánea, a pesar de inducir muerte neuronal en esta estructura.

Después de una lesión estriatal unilateral con AK se producen cambios en los receptores de dopamina D1R y D2R. Estos cambios incluyen cambios en la abundancia de su mRNA y su proteína, posiblemente en su afinidad y en el estado de fosforilación de DARPP32 Thr⁷⁵.

Estos cambios son diferentes en el estriado inyectado comparado con los cambios observados el estriado contralateral; son distintos entre siete y treinta días después de la lesión; y además no son iguales en hembras que en machos.

Estos datos sugieren una respuesta diferencial, en términos de receptores de DA, ante un daño estriatal que podría estar asociado con hormonas sexuales y que permitiría explicar las diferencias de género y de tiempo en las manifestaciones motoras de lesiones estriatales o de patologías como la enfermedad de Huntington.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Ahlgren-Beckendorf JA, Levant B. 2004. Signaling mechanisms of the D3 dopamine receptor. *J Recept Signal Transduct Res* 24:117-130.
- Ahn JH, McAvoy T, Rakhilin SV, Nishi A, Greengard P, Nairn AC. 2007. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2979-2984.
- Akhisaroglu M, Kurtuncu M, Manev H, Uz T. 2005. Diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors and striatal D2/D3 receptor levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 80:371-377.
- Alcantara AA, Chen V, Herring BE, Mendenhall JM, Berlanga ML. 2003. Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res* 986:22-29.
- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Andersson K, Schwarcz R, Fuxe K. 1980. Compensatory bilateral changes in dopamine turnover after striatal kainate lesion. *Nature* 283:94-96.
- Araki KY, Sims JR, Bhide PG. 2007. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res* 1156:31-45.
- Ariano MA, Aronin N, DiFiglia M, Tagle DA, Sibley DR, Leavitt BR, Hayden MR, Levine MS. 2002. Striatal neurochemical changes in transgenic models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 68:716-729.
- Bal A, Bachelot T, Savasta M, Manier M, Verna JM, Benabid AL, Feuerstein C. 1994. Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res Mol Brain Res* 23:204-212.
- Bateup HS, Svenningsson P, Kuroiwa M, Gong S, Nishi A, Heintz N, Greengard P. 2008. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci* 11:932-939.
- Becker JB. 1999. Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 64:803-812.
- Beckstead RM. 1988. Association of dopamine D1 and D2 receptors with specific cellular elements in the basal ganglia of the cat: the uneven topography of dopamine receptors in the striatum is determined by intrinsic striatal cells, not nigrostriatal axons. *Neuroscience* 27:851-863.
- Beckstead RM, Kersey KS. 1985. Immunohistochemical demonstration of differential substance P-, met-enkephalin-, and glutamic-acid-decarboxylase-containing cell body and axon distributions in the corpus striatum of the cat. *J Comp Neurol* 232:481-498.
- Bentivoglio M, van der Kooy D, Kuypers HG. 1979. The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res* 174:1-17.
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E, Girault JA. 2008. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28:5671-5685.

Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Haganir RL, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Greengard P. 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402:669-671.

Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messer A, Greengard P. 2000. Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6809-6814.

Bode FJ, Stephan M, Suhling H, Pabst R, Straub RH, Raber KA, Bonin M, Nguyen HP, Riess O, Bauer A, Sjoberg C, Petersen A, von Horsten S. 2008. Sex differences in a transgenic rat model of Huntington's disease: decreased 17beta-estradiol levels correlate with reduced numbers of DARPP32+ neurons in males. *Hum Mol Genet* 17:2595-2609.

Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. 2009. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 30:142-157.

Brown AM, Deutch AY, Colbran RJ. 2005. Dopamine depletion alters phosphorylation of striatal proteins in a model of Parkinsonism. *Eur J Neurosci* 22:247-256.

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.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M. 2007. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211-219.

Campochiaro P, Schwarcz R, Coyle JT. 1977. GABA receptor binding in rat striatum: localization and effects of denervation. *Brain Res* 136:501-511.

Centonze D, Usiello A, Gubellini P, Pisani A, Borrelli E, Bernardi G, Calabresi P. 2002. Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology* 27:723-726.

Cepeda C, Andre VM, Yamazaki I, Wu N, Kleiman-Weiner M, Levine MS. 2008. Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur J Neurosci* 27:671-682.

Cole DG, Kobiarski LA, Konradi C, Hyman SE. 1994. 6-Hydroxydopamine lesions of rat substantia nigra up-regulate dopamine-induced phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein in striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9631-9635.

Collingridge GL, Lester RA. 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.

Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB. 1998. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6480-6485.

Chen Q, Veenman CL, Reiner A. 1996. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience* 73:715-731.

Chesselet MF, Graybiel AM. 1983. Met-enkephalin-like and dynorphin-like immunoreactivities of the basal ganglia of the cat. *Life Sci* 33 Suppl 1:37-40.

Cosi C, Guerin K, Marien M, Koek W, Rollet K. 2004. The PARP inhibitor benzamide protects against kainate and NMDA but not AMPA lesioning of the mouse striatum in vivo. *Brain Res* 996:1-8.

- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH. 1989. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-4034.
- David HN, Anseau M, Abriani JH. 2005. Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Res Brain Res Rev* 50:336-360.
- De Simoni MG, Dal Toso G, Fodritto F, Sokola A, Algeri S. 1987. Modulation of striatal dopamine metabolism by the activity of dorsal raphe serotonergic afferences. *Brain Res* 411:81-88.
- Di Chiara G, Morelli M, Consolo S. 1994. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* 17:228-233.
- Di Paolo T, Falardeau P, Morissette M. 1988. Striatal D-2 dopamine agonist binding sites fluctuate during the rat estrous cycle. *Life Sci* 43:665-672.
- Diaz J, Levesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P. 1995. Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65:731-745.
- Drew KL, Lyon RA, Titeler M, Glick SD. 1986. Asymmetry in D-2 binding in female rat striata. *Brain Res* 363:192-195.
- Dube L, Smith AD, Bolam JP. 1988. Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 267:455-471.
- Duveau V, Fritschy JM. PSA-NCAM-dependent GDNF signaling limits neurodegeneration and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 32:89-98.
- Fasano S, D'Antoni A, Orban PC, Valjent E, Putignano E, Vara H, Pizzorusso T, Giustetto M, Yoon B, Soloway P, Maldonado R, Caboche J, Brambilla R. 2009. Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor 1 (Ras-GRF1) Controls Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling in the Striatum and Long-Term Behavioral Responses to Cocaine. *Biol Psychiatry*.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M. 2001. Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 94:48-58.
- Fishburn CS, Elazar Z, Fuchs S. 1995. Differential glycosylation and intracellular trafficking for the long and short isoforms of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 270:29819-29824.
- Flores-Hernandez J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ. 2000. D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* 83:2996-3004.
- Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM. 1999. Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:52-56.
- Gerfen CR. 1989. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246:385-388.
- Gerfen CR. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15:285-320.

- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. 2002. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci* 22:5042-5054.
- Gertler TS, Chan CS, Surmeier DJ. 2008. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 28:10814-10824.
- Gil JM, Rego AC. 2008. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27:2803-2820.
- Gimenez-Amaya JM, McFarland NR, de las Heras S, Haber SN. 1995. Organization of thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *J Comp Neurol* 354:127-149.
- Gingrich JA, Dearry A, Falardeau P, Bates MD, Fremeau RT, Jr., Caron MG. 1992. Location and molecular cloning of D1 dopamine receptor. *Neurochem Int* 20 Suppl:9S-15S.
- Giordano M, Mejia-Viggiano MC. 2001. Gender differences in spontaneous and MK-801-induced activity after striatal lesions. *Brain Res Bull* 56:553-561.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97:505-519.
- Glick SD, Lyon RA, Hinds PA, Sowell C, Titeler M. 1988. Correlated asymmetries in striatal D1 and D2 binding: relationship to apomorphine-induced rotation. *Brain Res* 455:43-48.
- Graybiel AM. 2000. The basal ganglia. *Curr Biol* 10:R509-511.
- Graybiel AM. 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359-387.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC. 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Haber SN, Kunishio K, Mizobuchi M, Lynd-Balta E. 1995. The orbital and medial prefrontal circuit through the primate basal ganglia. *J Neurosci* 15:4851-4867.
- Halpain S, Girault JA, Greengard P. 1990. Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. *Nature* 343:369-372.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. 2000. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI. 1995. Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15:5222-5237.
- Herve D, Rogard M, Levi-Strauss M. 1995. Molecular analysis of the multiple Golf alpha subunit mRNAs in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 32:125-134.
- Hruska RE, Ludmer LM, Pitman KT, De Ryck M, Silbergeld EK. 1982. Effects of Estrogen on Striatal Dopamine receptor function in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 16:285-291.

Impey S, Obrietan K, Storm DR. 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.

Ishibashi K, Ishii K, Oda K, Kawasaki K, Mizusawa H, Ishiwata K. 2009. Regional analysis of age-related decline in dopamine transporters and dopamine D2-like receptors in human striatum. *Synapse* 63:282-290.

Jarvie KR, Booth G, Brown EM, Niznik HB. 1989. Glycoprotein nature of dopamine D1 receptors in the brain and parathyroid gland. *Mol Pharmacol* 36:566-574.

Johnson KB, Criswell HE, Jensen KF, Simson PE, Mueller RA, Breese GR. 1992. Comparison of the D1-dopamine agonists SKF-38393 and A-68930 in neonatal 6-hydroxydopamine-lesioned rats: behavioral effects and induction of c-fos-like immunoreactivity. *J Pharmacol Exp Ther* 262:855-865.

Jones EG, Coulter JD, Burton H, Porter R. 1977. Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *J Comp Neurol* 173:53-80.

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

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

Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS. 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7731-7736.

Klug JM, Norman AB. 1993. Long-term sensitization of apomorphine-induced rotation behavior in rats with dopamine deafferentation or excitotoxin lesions of the striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 46:397-403.

Kotter R. 1994. Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum. *Prog Neurobiol* 44:163-196.

Kunishio K, Haber SN. 1994. Primate cingulostratial projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *J Comp Neurol* 350:337-356.

Kwon YG, Huang HB, Desdouits F, Girault JA, Greengard P, Nairn AC. 1997. Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3536-3541.

Larisch R, Meyer W, Klimke A, Kehren F, Vosberg H, Muller-Gartner HW. 1998. Left-right asymmetry of striatal dopamine D2 receptors. *Nucl Med Commun* 19:781-787.

Lerma J. 2004. [Synaptic physiology of the kainate receptors and its influence in epileptogenesis]. *Neurologia* 19:106-116.

Levesque D, Di Paolo T. 1990. Effect of the rat estrous cycle at ovariectomy on striatal D-1 dopamine receptors. *Brain Res Bull* 24:281-284.

Levesque D, Di Paolo T. 1993. Modulation by estradiol and progesterone of the GTP effect on striatal D-2 dopamine receptors. *Biochem Pharmacol* 45:723-733.

Levesque D, Gagnon S, Di Paolo T. 1989. Striatal D1 dopamine receptor density fluctuates during the rat estrous cycle. *Neurosci Lett* 98:345-350.

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ, et al. 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8861-8865.

- Lindgren N, Usiello A, Gojny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G. 2003. Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4305-4309.
- Lindskog M, Kim M, Wikstrom MA, Blackwell KT, Kotaleski JH. 2006. Transient calcium and dopamine increase PKA activity and DARPP-32 phosphorylation. *PLoS Comput Biol* 2:e119.
- Liu Y, Buck DC, Neve KA. 2008. Novel interaction of the dopamine D2 receptor and the Ca²⁺ binding protein S100B: role in D2 receptor function. *Mol Pharmacol* 74:371-378.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lopez-Illasaca M. 1998. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* 56:269-277.
- Lozano AM, Lang AE, Hutchison WD, Dostrovsky JO. 1998. New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol* 8:783-790.
- Mao L, Tang Q, Samdani S, Liu Z, Wang JQ. 2004. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci* 19:1207-1216.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609-614.
- Matyja E. 1986. Morphologic evidence of a primary response of gila to kainic acid administration into the rat neostriatum; studied in vivo and in vitro. *Exp Neurol* 92:609-623.
- McGeer PL, McGeer EG. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474-483.
- Mesco ER, Joseph JA, Roth GS. 1992. Selective susceptibility of cultured striatal neurons to kainic acid. *J Neurosci Res* 31:341-345.
- Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N. 2004. Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res* 1029:120-123.
- Montmayeur JP, Guiramand J, Borrelli E. 1993. Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol* 7:161-170.
- Muly EC, Senyuz M, Khan ZU, Guo JD, Hazra R, Rainnie DG. 2009. Distribution of D1 and D5 dopamine receptors in the primate and rat basolateral amygdala. *Brain Struct Funct* 213:375-393.
- Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG, Furshpan EJ. 1998. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11975-11980.
- Nairn AC, Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Greengard P. 2004. The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:14-23.
- Nakai M, Qin ZH, Chen JF, Wang Y, Chase TN. 2000. Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation. *J Neurochem* 74:647-658.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. 2004. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24:165-205.
- Nishi A, Bibb JA, Snyder GL, Higashi H, Nairn AC, Greengard P. 2000. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12840-12845.

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

Nishi A, Watanabe Y, Higashi H, Tanaka M, Nairn AC, Greengard P. 2005. Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1199-1204.

Noain D, Avale ME, Wedemeyer C, Calvo D, Peper M, Rubinstein M. 2006. Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *Eur J Neurosci* 24:2429-2438.

Norman AB, Norgren RB, Wyatt LM, Hildebrand JP, Sanberg PR. 1992. The direction of apomorphine-induced rotation behavior is dependent on the location of excitotoxin lesions in the rat basal ganglia. *Brain Res* 569:169-172.

Onn SP, West AR, Grace AA. 2000. Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. *Trends Neurosci* 23:S48-56.

Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S. 2008. Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 28:10090-10101.

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

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

Parthasarathy HB, Schall JD, Graybiel AM. 1992. Distributed but convergent ordering of corticostriatal projections: analysis of the frontal eye field and the supplementary eye field in the macaque monkey. *J Neurosci* 12:4468-4488.

Paxinos G, Watson C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition. Academic Press Australia.

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 D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurochem* 62:411-420.

Reddy PH, Williams M, Tagle DA. 1999. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 22:248-255.

Richfield EK, O'Brien CF, Eskin T, Shoulson I. 1991. Heterogeneous dopamine receptor changes in early and late Huntington's disease. *Neurosci Lett* 132:121-126.

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

Rivera A, Alberti I, Martin AB, Narvaez JA, de la Calle A, Moratalla R. 2002. Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci* 16:2049-2058.

Rivera A, Cuellar B, Giron FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R. 2002. Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80:219-229.

Roos RA, Vegter-van der Vlis M, Hermans J, Elshove HM, Moll AC, van de Kamp JJ, Bruyn GW. 1991. Age at onset in Huntington's disease: effect of line of inheritance and patient's sex. *J Med Genet* 28:515-519.

- Saint-Cyr JA, Ungerleider LG, Desimone R. 1990. Organization of visual cortical inputs to the striatum and subsequent outputs to the pallido-nigral complex in the monkey. *J Comp Neurol* 298:129-156.
- Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M. 2001. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:161-172.
- Schneider LH, Murphy RB, Coons EE. 1982. Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats. *Neurosci Lett* 33:281-284.
- Schwarcz R, Coyle JT. 1977. Striatal lesions with kainic acid: neurochemical characteristics. *Brain Res* 127:235-249.
- Schwarcz R, Fuxe K, Agnati LF, Hokfelt T, Coyle JT. 1979. Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* 170:485-495.
- Schwarcz R, Fuxe K, Hokfelt T, Terenius L, Goldstein M. 1980. Effects of chronic striatal kainate lesions on some dopaminergic parameters and enkephalin immunoreactive neurons in the basal ganglia. *J Neurochem* 34:772-778.
- Severson JA, de Vellis JS, Finch CE. 1983. [3H]spiperone binding sites in rat primary glial cultures, C6 glioma, and B104 neuroblastoma. *J Neurosci Res* 9:21-26.
- Shaul YD, Seger R. 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773:1213-1226.
- Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P. 1998. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18:10297-10303.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Strauss S, Otten U, Joggerst B, Pluss K, Volk B. 1994. Increased levels of nerve growth factor (NGF) protein and mRNA and reactive gliosis following kainic acid injection into the rat striatum. *Neurosci Lett* 168:193-196.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228-235.
- Suzuki M, Hatano K, Sakiyama Y, Kawasumi Y, Kato T, Ito K. 2001. Age-related changes of dopamine D1-like and D2-like receptor binding in the F344/N rat striatum revealed by positron emission tomography and in vitro receptor autoradiography. *Synapse* 41:285-293.
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P. 2004. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:269-296.
- Takada M, Tokuno H, Nambu A, Inase M. 1998. Corticostriatal projections from the somatic motor areas of the frontal cortex in the macaque monkey: segregation versus overlap of input zones from the primary motor cortex, the supplementary motor area, and the premotor cortex. *Exp Brain Res* 120:114-128.
- Taverna S, Ilijic E, Surmeier DJ. 2008. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28:5504-5512.
- Turjanski N, Weeks R, Dolan R, Harding AE, Brooks DJ. 1995. Striatal D1 and D2 receptor binding in patients with Huntington's disease and other choreas. A PET study. *Brain* 118 (Pt 3):689-696.

- Ungerstedt U. 1971. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:69-93.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Fisone G, Girault JA. 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 32:538-547.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D, Girault JA. 2005. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:491-496.
- Van Hoesen GW, Yeterian EH, Lavizzo-Mourey R. 1981. Widespread corticostriate projections from temporal cortex of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 199:205-219.
- Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J. 1999. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* 19:136-146.
- Vázquez I. El papel de los receptores dopaminérgicos estriatales en las alteraciones conductuales en un modelo de la enfermedad de Huntington Tesis (Maestría en Ciencias (Neurobiología)). Querétaro. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Neurobiología. 2006. 70 p.
- Walaas SI, Aswad DW, Greengard P. 1983. A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301:69-71.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. 2005. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:3-16.
- Wang Y, Gu ZL, Cao Y, Liang ZQ, Han R, Bennet MC, Quin ZH. 2006. Lysosomal enzyme cathepsin B is involved in kainic acid-induced excitotoxicity in rat striatum. *Brain Res.* 1071: 245-249.
- Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ. 2006. Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50:443-452.
- Weinreich P, Seeman P. 1980. Effect of kainic acid on striatal dopamine receptors. *Brain Res* 198:491-496.
- Wirz-Justice A. 1987. Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors. *Prog Neurobiol.* 29:219-259.
- Wisden W, Seeburg PH. 1993. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13:3582-3598.
- Wong-Riley MT. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.
- Xu SX, Monsma FJ, Jr., Sibley DR, Creese I. 1992. Regulation of D1A and D2 dopamine receptor mRNA during ontogenesis, lesion and chronic antagonist treatment. *Life Sci* 50:383-396.
- Xu ZC, Ling G, Sahr RN, Neal-Beliveau BS. 2005. Asymmetrical changes of dopamine receptors in the striatum after unilateral dopamine depletion. *Brain Res* 1038:163-170.
- Yasuda H, Fujii M, Fujisawa H, Ito H, Suzuki M. 2001. Changes in nitric oxide synthesis and epileptic activity in the contralateral hippocampus of rats following intrahippocampal kainate injection. *Epilepsia* 42:13-20.

Zaczek R, Schwarcz R, Coyle JT. 1978. Long-term sequelae of striatal kainate lesion. *Brain Res* 152:626-632.

Zanassi P, Paolillo M, Montecucco A, Avvedimento EV, Schinelli S. 1999. Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci Res* 58:544-552.

Zhang L, Joseph JA, Roth GS. 1997. Effect of aging on vulnerability of striatal D1 and D2 dopamine receptor-containing neurons to kainic acid. *Brain Res* 763:264-266.

Zhou L, Nazarian A, Sun WL, Jenab S, Quinones-Jenab V. 2009. Basal and cocaine-induced sex differences in the DARPP-32-mediated signaling pathway. *Psychopharmacology (Berl)* 203:175-183.

12 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito simplificado de los ganglios basales en la rata.	5
Figura 2. Vía de señalización intracelular mediada por los receptores de dopamina D1R en las NME de la vía directa.	8
Figura 3. Vía de señalización intracelular mediada por los receptores de dopamina D2R en las NME de la vía indirecta.	9
Figura 5. Caracterización histológica de la lesión estriatal 7 días después de la inyección unilateral con AK.	28
Figura 6. Caracterización histológica de la lesión estriatal 30 días después de la inyección unilateral con AK.	29
Figura 7. Porcentaje de cambio de la unión a 0.2 nM de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 a membranas estriatales después de una inyección unilateral con AK.	30
Figura 8. Porcentaje de cambio de la unión a 0.15 nM de $^3\text{[H]}$ spiperona a membranas estriatales después de una inyección unilateral con AK.	31
Figura 9. Porcentaje de cambio de la expresión relativa de la proteína D1R (~49 KDa y ~70 KDa) después de una inyección unilateral con AK.	32
Figura 10. Porcentaje de cambio de la expresión relativa de la proteína D2R _S y _L después de una inyección unilateral con AK.	33
Figura 11. Porcentaje de cambio de la expresión relativa del mRNA de D1R después de una inyección unilateral con AK.	35
Figura 12. Porcentaje de cambio de la expresión relativa del mRNA de D2R _L después de una inyección unilateral con AK.	36
Figura 13. Porcentaje de cambio de la fosforilación Thr ⁷⁵ de DARPP32 en el estriado después de una lesión unilateral con AK.	37
Figura 14. Porcentaje de cambio de la fosforilación de las ERK 1/2 en el estriado después de una lesión unilateral con AK.	38
Figura 15. Actividad de citocromo oxidasa en cortes representativos de estriado lesionado unilateralmente con AK.	62
Figura 16. Unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 (0.2 nM) a membranas estriatales después de una inyección unilateral con PBS o AK.	63
Figura 17. Unión de $^3\text{[H]}$ spiperona (0.15 nM) a membranas estriatales después de una inyección unilateral con PBS o AK.	64
Figura 18. Expresión relativa de la proteína del receptor de dopamina D1R en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.	66
Figura 19. Expresión relativa del receptor de dopamina D2R en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.	67

Figura 20. Expresión relativa del mRNA del receptor de dopamina D1R en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.	68
Figura 21. Expresión relativa del mRNA del receptor de dopamina D2R _L en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.	69
Figura 22. Fosforilación de DARPP32 (Thr ⁷⁵) en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.	70
Figura 23. Fosforilación de ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴) en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.	71
Figura 24. Amplificación del mRNA de D1R y D2R _L por PCR de punto final.	73
Figura 25. Determinación de la eficiencia de amplificación de β actina, D1R y D2R.	74

13 APÉNDICE I

13.1 *Actividad de citocromo oxidasa en el estriado lesionado con AK*

La actividad de citocromo *c* oxidasa ha sido utilizada como un marcador metabólico de actividad neuronal (Wong-Riley, 1989). Esta enzima está localizada en la membrana interna mitocondrial y transfiere electrones de su sustrato reducido ferrocitocromo *c* al oxígeno molecular para formar agua, generando ATP como último paso de la cadena de transporte de electrones. La glía contribuye mínimamente a la actividad de citocromo *c* oxidasa del cerebro, de acuerdo con el hecho de que estas células dependen más de la glucólisis que del metabolismo oxidativo. En la técnica utilizada en este trabajo, la diaminobenzidina sirve como donador de electrones para el complejo citocromo *c* - citocromo *c* oxidasa, y al oxidarse esta molécula forma un precipitado que puede observarse con microscopía de luz.

En la figura 15 se muestran cortes representativos del estriado de ratas inyectado con 5 nmol de AK (IPSI), en comparación con el lado no inyectado (CONTRA). Los cortes fueron procesados para observar la actividad de citocromo *c* oxidasa.

Se observó una disminución en la actividad de esta enzima después de la inyección con AK, únicamente en el lado inyectado. Esto sugiere que se produce muerte celular neuronal, ya que las células gliales contribuyen poco a esta actividad. En el estriado inyectado con PBS no se observa disminución en la actividad de citocromo *c* oxidasa (no mostrado).

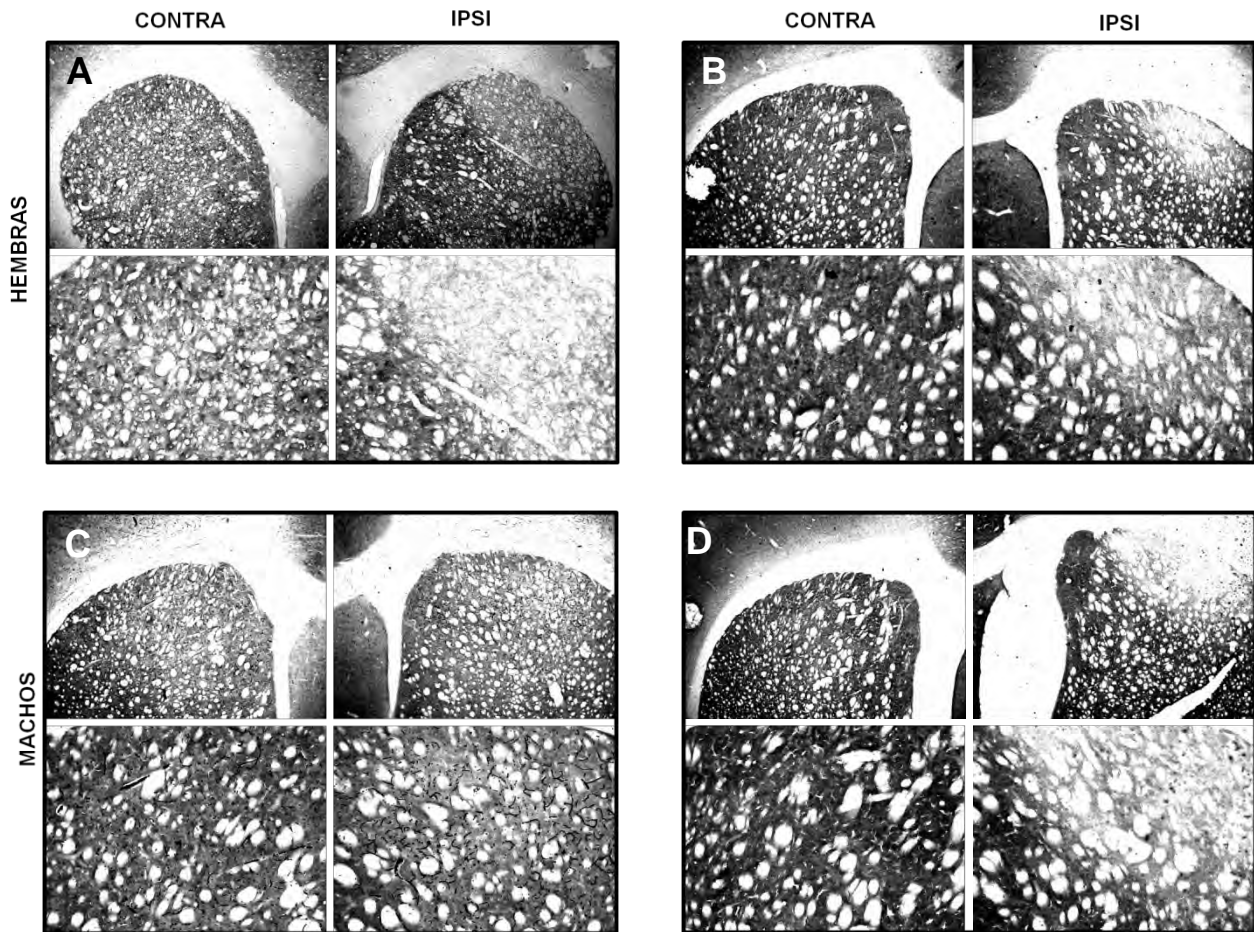


Figura 15. Actividad de citocromo oxidasa en cortes representativos de estriado lesionado unilateralmente con AK.

Se muestran cortes representativos del estriado de ratas 7 (A y C) y 30 (B y D) días después de la inyección unilateral con AK, tanto en ratas hembra (A y B) como en ratas macho (C y D). En cada panel se muestra el lado contralateral a la inyección (CONTRA) y el lado inyectado con AK (IPSI).

14 APÉNDICE II

14.1 Evaluación de la unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 a membranas estriatales

En la figura 16 se muestra la unión específica del antagonista selectivo para los receptores de dopamina D1R, $^3\text{[H]}$ SCH23390 (0.2 nM), a membranas estriatales 7 y 30 días después de la inyección con PBS o AK.

Se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en la unión de este radioligando en hembras 7 días después de la lesión con AK, con respecto al control PBS (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0495$; CONTRA, $U = 0$, $p = 0.045$) y 30 (IPSI, $U = 0$, $p = 0.045$). Además, en hembras se observó un valor menor (~50%) en la unión a este radioligando en el lado IPSI PBS comparado con el CONTRA PBS, tanto 7 ($U = 0$, $p = 0.045$) como 30 ($U = 0$, $p = 0.045$) días después de la lesión.

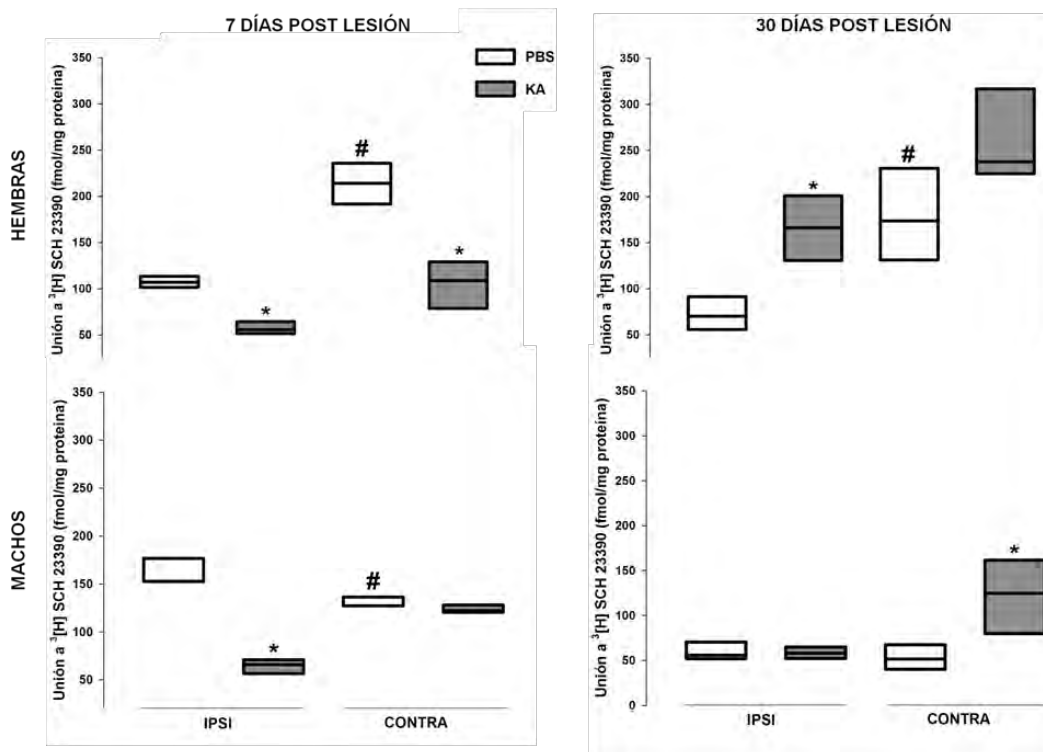


Figura 16. Unión de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 (0.2 nM) a membranas estriatales después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestran los valores de unión a 0.2 nM de $^3\text{[H]}$ SCH 23390 a membranas estriatales de ratas hembra y macho, 7 y 30 días después de la inyección con PBS o con AK. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS; # diferencia ($p < 0.05$) con respecto a la condición PBS IPSI. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección.

Se encontró una disminución en la unión a este radioligando en machos 7 días después de la inyección con AK (IPSI, $U = 0$, $p = 0.045$). Sin embargo 30 días post lesión se observó un aumento en la unión de $^3\text{[H]}$ SCH23390 en el lado contralateral ($U = 0$, $p = 0.045$). En machos se observaron valores mayores (~20%) en el lado inyectado con PBS 7 días post lesión, comparado con el CONTRA PBS ($U = 0$, $p = 0.045$). Esta diferencia no se observó a los 30 días post lesión.

14.2 Evaluación de la unión de $^3\text{[H]}$ spiperona a membranas estriatales

En la figura 17 se muestra la unión específica del antagonista selectivo para los receptores de dopamina D2R, $^3\text{[H]}$ spiperona (0.15 nM), a membranas estriatales 7 y 30 días después de una inyección con PBS o AK.

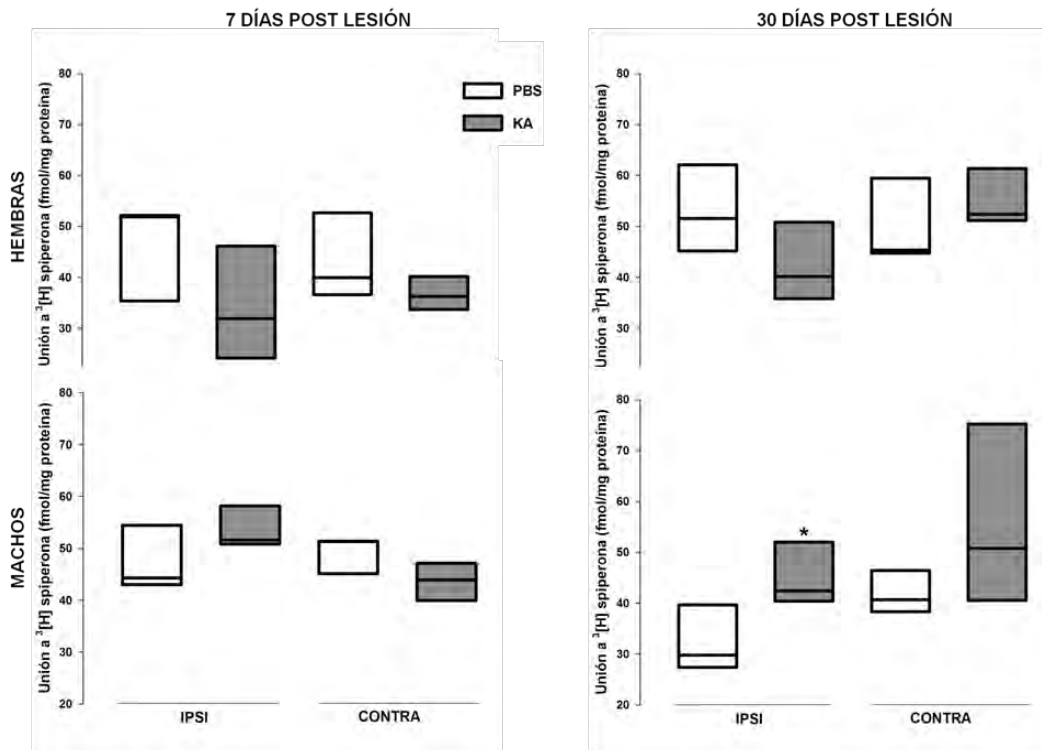


Figura 17. Unión de $^3\text{[H]}$ spiperona (0.15 nM) a membranas estriatales después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestran los valores de unión a 0.15 nM de $^3\text{[H]}$ spiperona a membranas estriatales de ratas hembra y macho, 7 y 30 días después de la inyección con AK o con PBS. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección.

Se observó un aumento en la unión de este radioligando únicamente en machos 30 días después de la lesión con AK, con respecto a la inyección con PBS (IPSI, $U = 0$, $p = 0.045$). No se encontraron diferencias entre IPSI y CONTRA PBS.

14.3 Evaluación de la abundancia relativa de la proteína de D1R

En la figura 18 se muestra la relación de la abundancia de la proteína de D1R relativa a la abundancia de la proteína de GAPDH, 7 y 30 días después de una inyección con PBS o AK. Como se describe en la sección de resultados, se evaluaron las bandas de 49 y 70 KDa (Figuras 18A y B, respectivamente).

Se observó una disminución de D1R (49 KDa) únicamente 7 días después de la inyección con AK (Figura 18A), tanto en hembras (IPSI, $U = 1$, $p = 0.0433$) como en machos (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0209$; CONTRA, $U = 1$, $p = 0.0433$) con respecto a los controles PBS. Se observó mayor abundancia (~22%) de D1R (49 KDa) en IPSI PBS con respecto a CONTRA PBS, únicamente en machos 7 días después de la inyección ($U = 0$, $p = 0.0209$).

Se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la abundancia de D1R ~70 KDa en hembras 7 días después de la inyección con AK (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0209$). Este aumento también se observa en machos IPSI KA 7 días post lesión, aunque el valor es de menor magnitud que el registrado en hembras y no es estadísticamente significativo.

14.4 Evaluación de la abundancia relativa de la proteína de D2R

En la figura 19 se muestra la relación de la abundancia de la proteína de D2R_S y L relativa a la abundancia de la proteína de GAPDH, 7 y 30 días después de una inyección con PBS o AK.

Se observó una disminución ($p < 0.05$) en la abundancia de la proteína de D2R únicamente en machos 30 días después de la lesión con AK, con respecto a la inyección con PBS (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0209$). Además se observó menor abundancia de D2R (~27%,) en IPSI PBS con respecto a CONTRA PBS en hembras 7 días después de la inyección ($U = 0$, $p = 0.0209$).

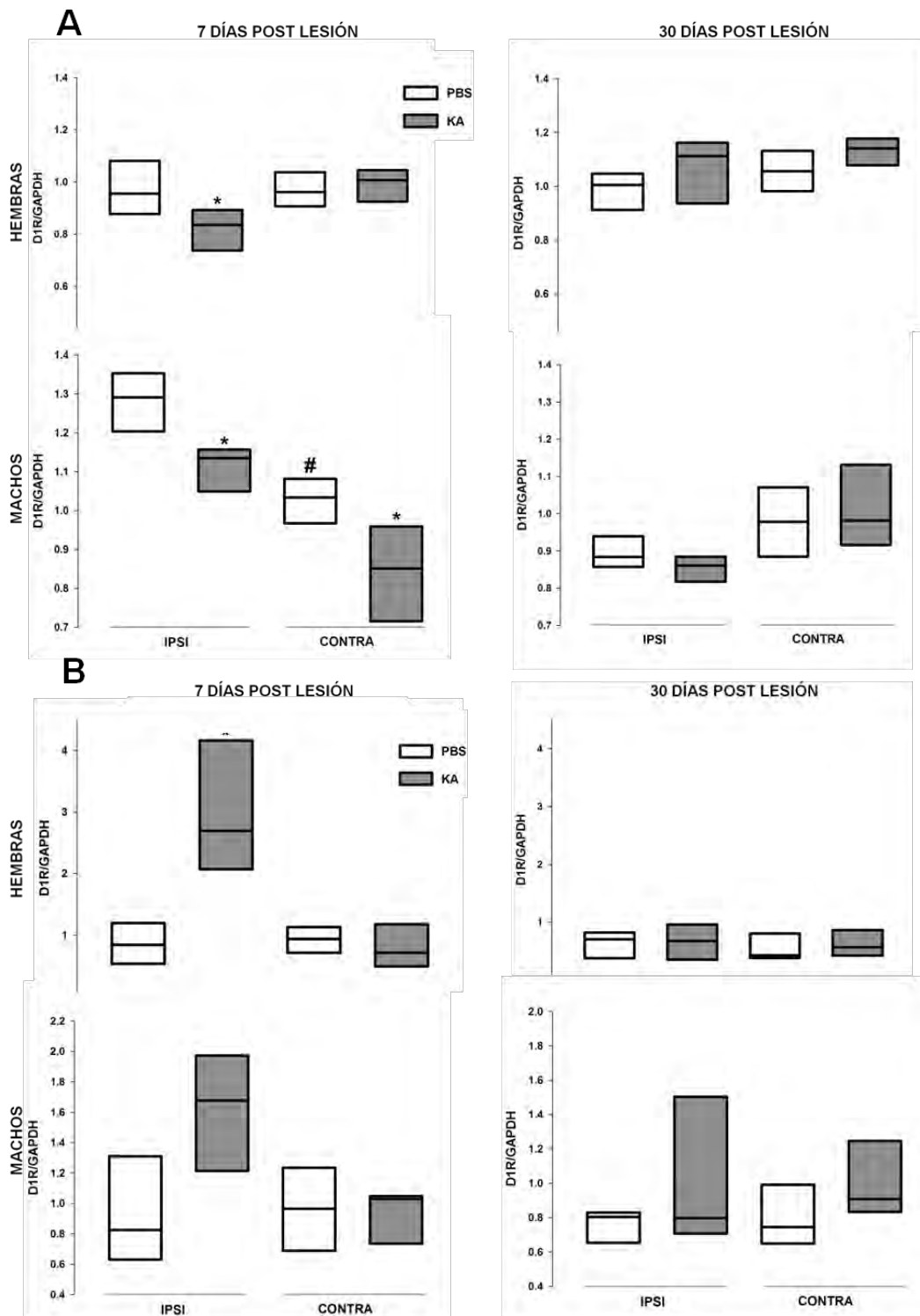


Figura 18. Expresión relativa de la proteína del receptor de dopamina D1R en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestran los valores de expresión relativa del receptor D1R con respecto a GAPDH en el estriado de ratas hembra y macho, 7 y 30 días después de la inyección con PBS o AK. A, banda de ~49 KDa; B, banda de ~70 KDa. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS; # diferencia ($p < 0.05$) con respecto a la condición PBS IPSI.

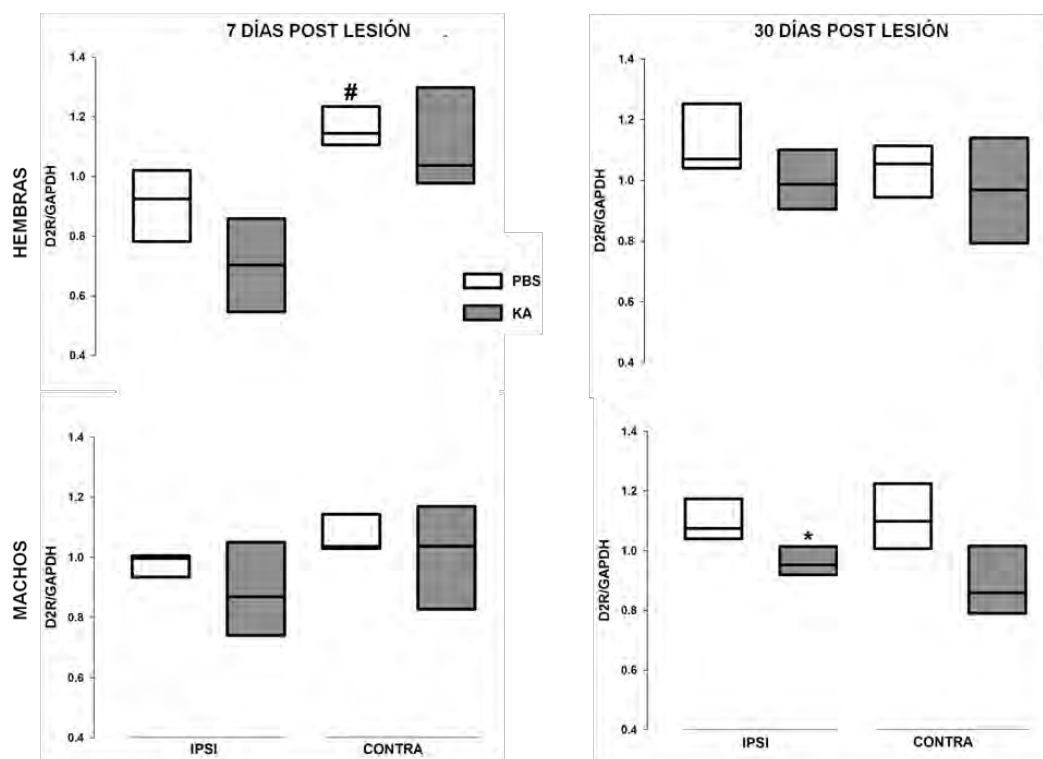


Figura 19. Expresión relativa del receptor de dopamina D2R en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestran los valores de expresión relativa del receptor D2R_S y L con respecto a GAPDH en el estriado de ratas hembra y macho, 7 y 30 días después de la inyección con AK o con PBS. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS; # diferencia ($p < 0.05$) con respecto a la condición PBS IPSI.

14.5 Evaluación de la abundancia relativa del mARN de D1R

En la figura 20 se muestra la expresión del mARN de D1R relativa a la expresión del mARN de β actina en el estriado, 7 y 30 días después de la inyección unilateral con PBS o AK.

Se observó una pequeña disminución ($p < 0.05$) en la abundancia relativa del mARN de este receptor en hembras 7 días después de la lesión con AK (IPSI, $U = 22.5$, $p = 0.0217$).

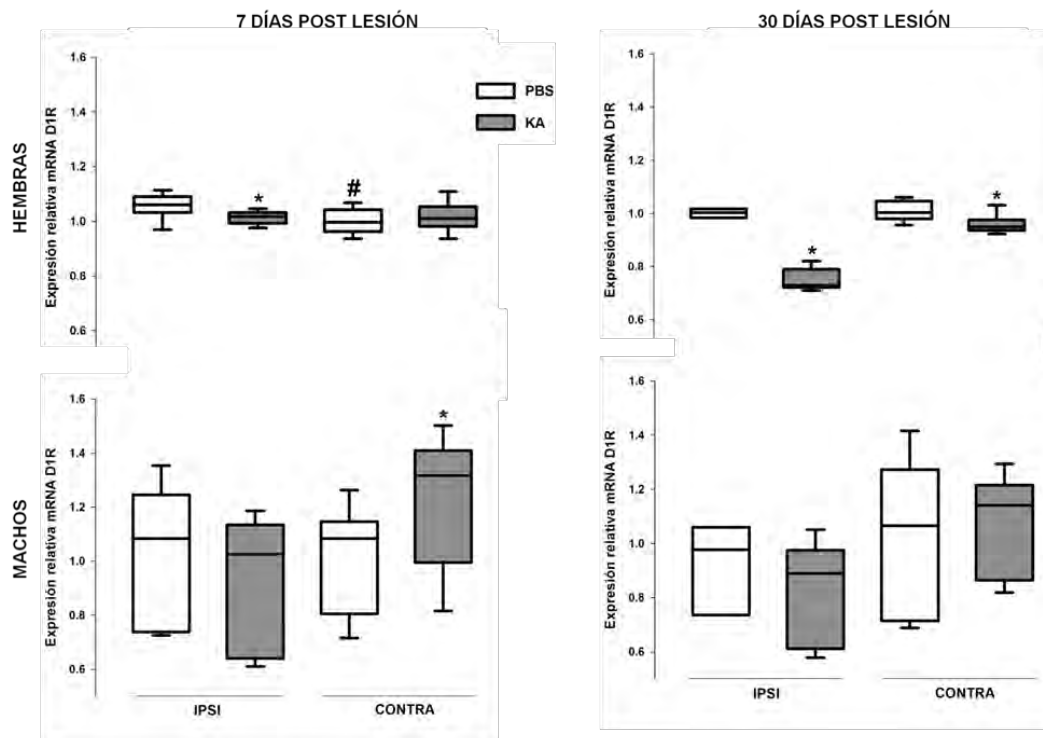


Figura 20. Expresión relativa del mARN del receptor de dopamina D1R en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestran los valores de expresión relativa de mARN del receptor D1R con respecto al mARN de β actina en el estriado de ratas hembra y macho, 7 y 30 días después de la inyección con PBS o AK. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS; # diferencia ($p < 0.05$) con respecto a la condición PBS IPSI.

Este valor aumentó en machos 7 días después de la lesión con AK (CONTRA, $U = 17.5$, $p = 0.0423$). Siete días después de la inyección con PBS se observa un valor ligeramente mayor (5%) de la abundancia de este mARN en IPSI PBS con respecto a CONTRA PBS, únicamente en hembras ($U = 13$, $p = 0.0152$). Treinta días después de la lesión se observa disminución del mARN de D1R tanto en el lado inyectado con AK como en el no inyectado con respecto al control PBS (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0009$; CONTRA, $U = 10$, $p = 0.0071$).

14.6 Evaluación de la abundancia relativa del mARN del receptor de dopamina $D2R_L$

En la figura 21 se muestra la abundancia del mARN de $D2R_L$ relativa a la abundancia del mARN de β actina.

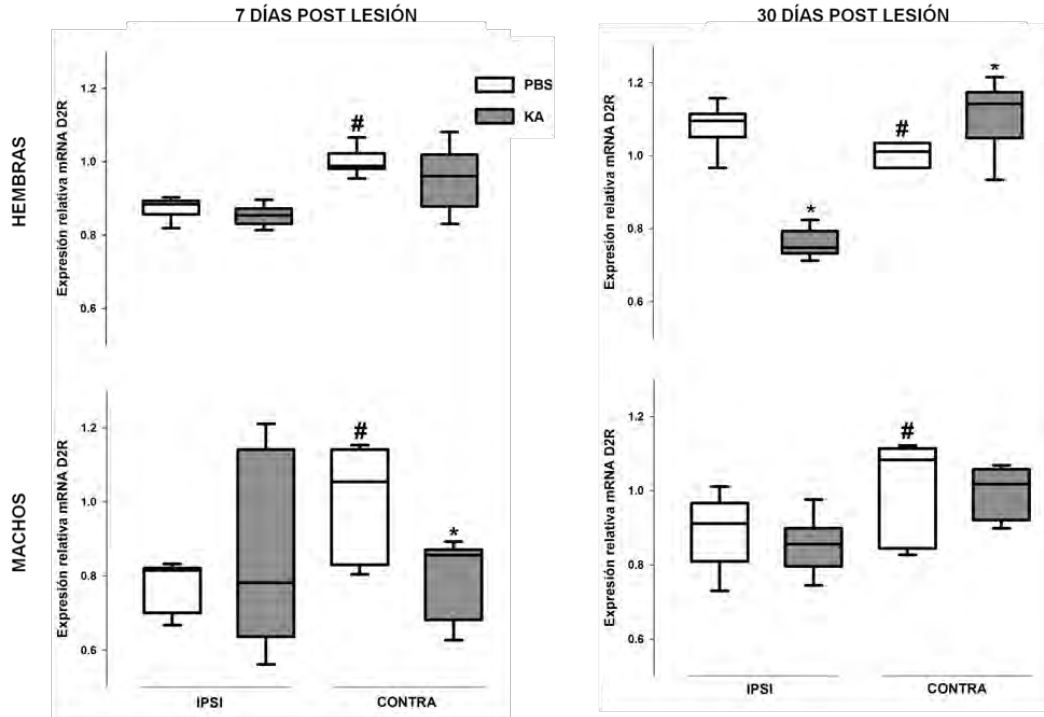


Figura 21. Expresión relativa del mRNA del receptor de dopamina D2R_L en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestran los valores de expresión relativa de mRNA del receptor D2R_L con respecto al mRNA de β actina en el estriado de ratas hembra y macho, 7 y 30 días después de la inyección con PBS o AK. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS; # diferencia ($p < 0.05$) con respecto a la condición PBS IPSI.

Siete días después de la inyección con AK únicamente se observó una disminución en la abundancia del mRNA de D2R en machos (CONTRA, $U = 16$, $p = 0.0305$). En hembras los cambios en la abundancia de este mRNA se observaron 30 días post lesión. En el lado inyectado con AK se observó disminución del mRNA (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0003$) mientras que en el lado no inyectado se observó un aumento (CONTRA, $U = 13$, $p = 0.0269$), con respecto a los grupos control PBS.

Además, en machos se observó una abundancia menor del mRNA de D2R en el lado IPSI PBS en comparación con CONTRA PBS, tanto 7 (~20%, $U = 17.5$, $p = 0.0423$) como 30 días post inyección (~15%, $U = 17.5$, $p = 0.0423$). En hembras se observó una abundancia menor de este mRNA en el lado IPSI PBS 7 días post lesión (~10%, $U = 0$, $p = 0.003$), mientras que 30 días post lesión se observó una abundancia ligeramente mayor en IPSI PBS, en comparación con CONTRA PBS (~8%, $U = 7.5$, $p = 0.0061$).

14.7 Evaluación del estado de fosforilación de DARPP32

En la figura 22 se muestra la tasa de fosforilación (Thr^{75}) de DARPP32 en el estriado con respecto a DARPP32 total, 7 y 30 días de la inyección con PBS o AK, evaluada por Western blot.

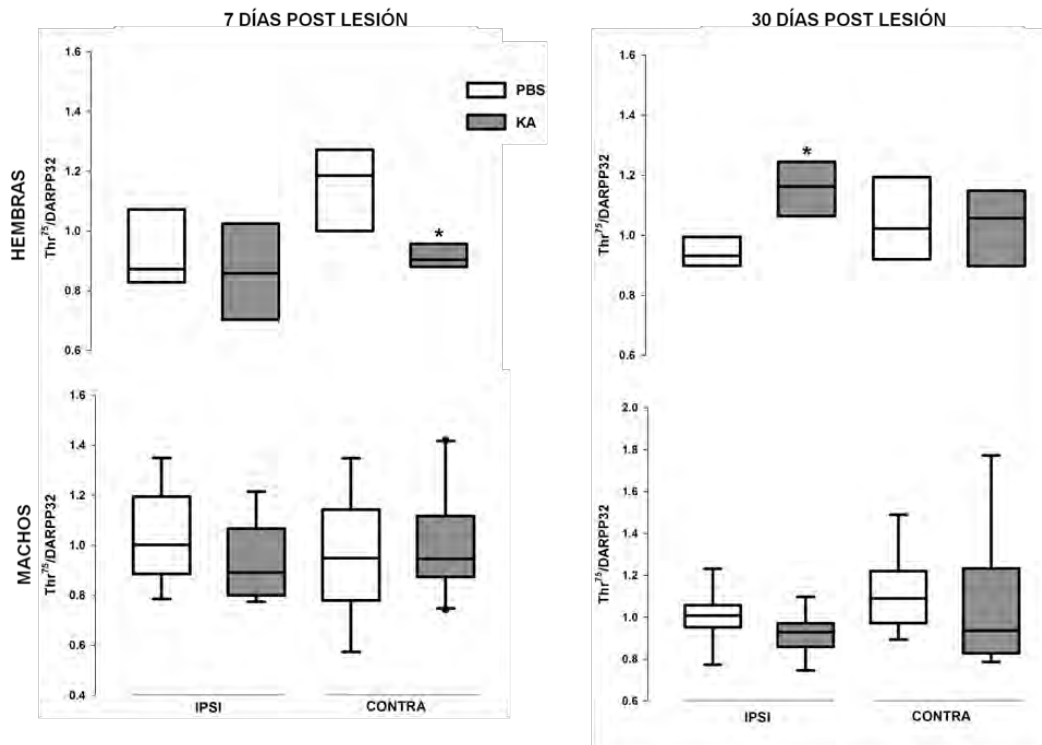


Figura 22. Fosforilación de DARPP32 (Thr^{75}) en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestra la relación de fosfoDARPP32 y DARPP32 total. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la fosforilación basal de Thr^{75} únicamente en hembras: Siete días post lesión se observó una disminución en el lado contralateral a la inyección con AK (CONTRA, $U = 0$, $p = 0.009$) mientras que 30 días post lesión se observó un aumento en el lado inyectado con AK (IPSI, $U = 0$, $p = 0.0209$), con respecto a los grupos control PBS. No se observaron diferencias en machos.

14.8 Evaluación del estado de fosforilación de las ERK1/2

En la figura 23 se muestra la tasa de fosforilación ($\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$) de las ERK1/2 en el estriado 7 y 30 días de la inyección con PBS o AK, evaluada por Western blot.

No se encontraron diferencias basales significativas en la tasa de fosforilación de estas MAPK después de una lesión con AK.

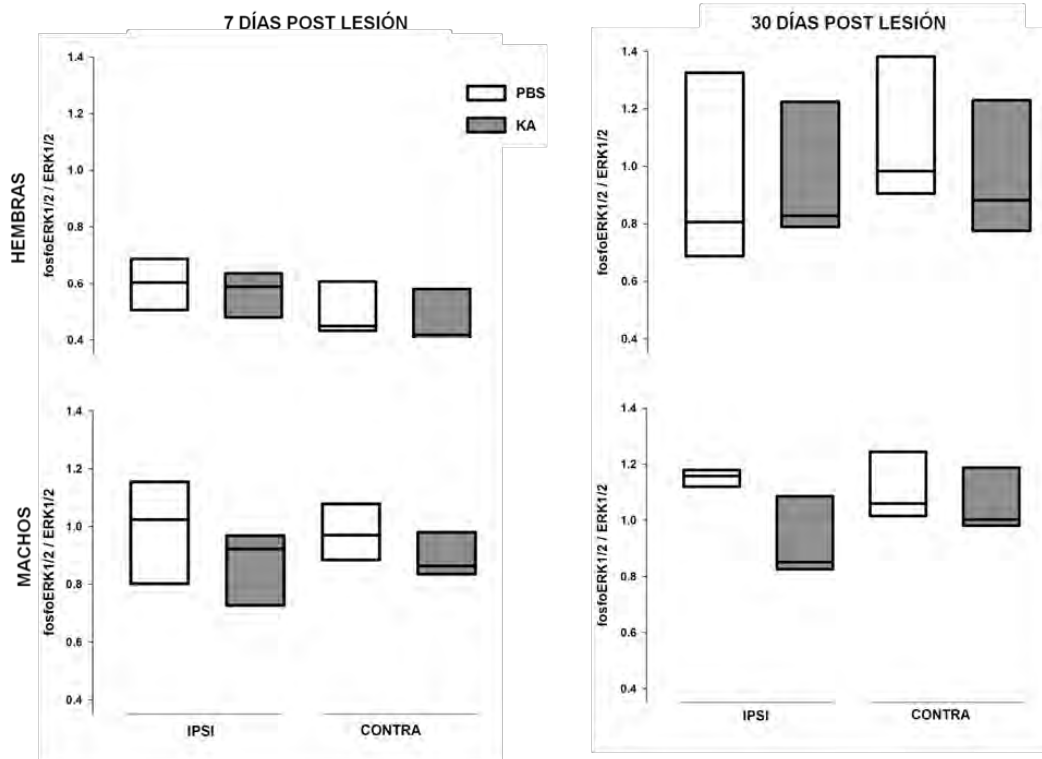


Figura 23. Fosforilación de las ERK1/2 ($\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$) en el estriado después de una inyección unilateral con PBS o AK.

Se muestra la relación de fosfoERK1/2 y ERK1/2 total. IPSI, estriado inyectado; CONTRA, estriado contralateral a la inyección. * Diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo PBS.

15 APÉNDICE III

15.1 Determinación del ciclo estral en ratas hembra

Antes del sacrificio se determinó la fase del ciclo estral de las ratas hembra.

Después de un frotis vaginal y su tinción con azul de metileno, se determinó la fase del ciclo de acuerdo con las poblaciones celulares presentes en el frotis (Marcondes et al., 2002).

En la siguiente tabla se muestra el número de ratas en cada fase del ciclo estral.

FASE TRATAMIENTO	diestro II		proestro		estro		diestro I	
	PBS	KA	PBS	KA	PBS	KA	PBS	KA
7 DÍAS	1	0	1	0	2	5	6	6
30 DÍAS	2	0	2	2	4	4	1	4

16 APÉNDICE IV

16.1 Estandarización de la reacción de RT PCR tiempo real

A continuación se describe la estandarización de la reacción de PCR en tiempo real, para determinar la abundancia del mRNA de D1R y D2R relativa a la abundancia del mRNA de β actina.

El producto de amplificación esperado es de 255 pb para D1R y de 111 pb para D2R (Figura 24). En ausencia de ADNc no se observa amplificación (Figura 24, controles negativos). La curva de disociación para cada par de oligonucleótidos permitió evaluar la formación de un solo producto de amplificación (no mostrado).

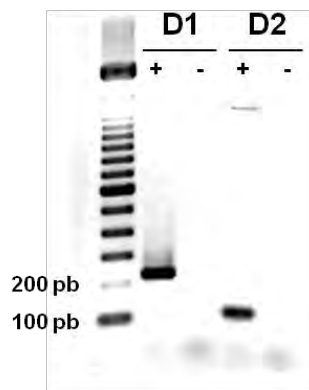


Figura 24. Amplificación del mRNA de D1R y D2R_L por PCR de punto final.

Para evaluar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos utilizados, se evaluó la amplificación de diluciones seriales de ADNc con cada par de oligonucleótidos. En la figura 25 se muestran las curvas de amplificación del mRNA de D1R, D2R_L y β actina, así como la eficiencia de amplificación obtenida. La eficiencia obtenida fue buena, dado que la eficiencia ideal es de 2 ($E = 10^{-1/\text{pendiente}}$). Dado que la eficiencia de amplificación para los tres genes es muy similar, se puede utilizar la abundancia del mRNA de β actina para evaluar la expresión relativa del mRNA de D1R y D2R_L. Para los tres genes evaluados, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, 50 ciclos de amplificación (5 segundos a 95°C, 8 segundos a 64°C, 10 segundos a 72°C), un ciclo de 15 segundos a

65°C (Que corresponde a la curva de disociación), y finalmente un ciclo de 30 segundos a 40°C. Las secuencias de los oligonucleótidos usados son: D1R sentido, 5'-CAGTCCATGCCAAGAATTGCCAGA-3' y D1R antisentido, 5'-AATCGATGCAGAATGGCTGGGTCT-3' (Muly et al., 2009); D2R_L sentido, 5'-TGAACAGGCGGAGAATGG-3' y D2R antisentido, 5'-CTGGTGCTTGACAGCATCTC-3'; β actina sentido, 5'- GCTACAGCTTCACCACCACA-3' y β actina antisentido 5'-AGTTTCATGGATGCCACAGG-3'.

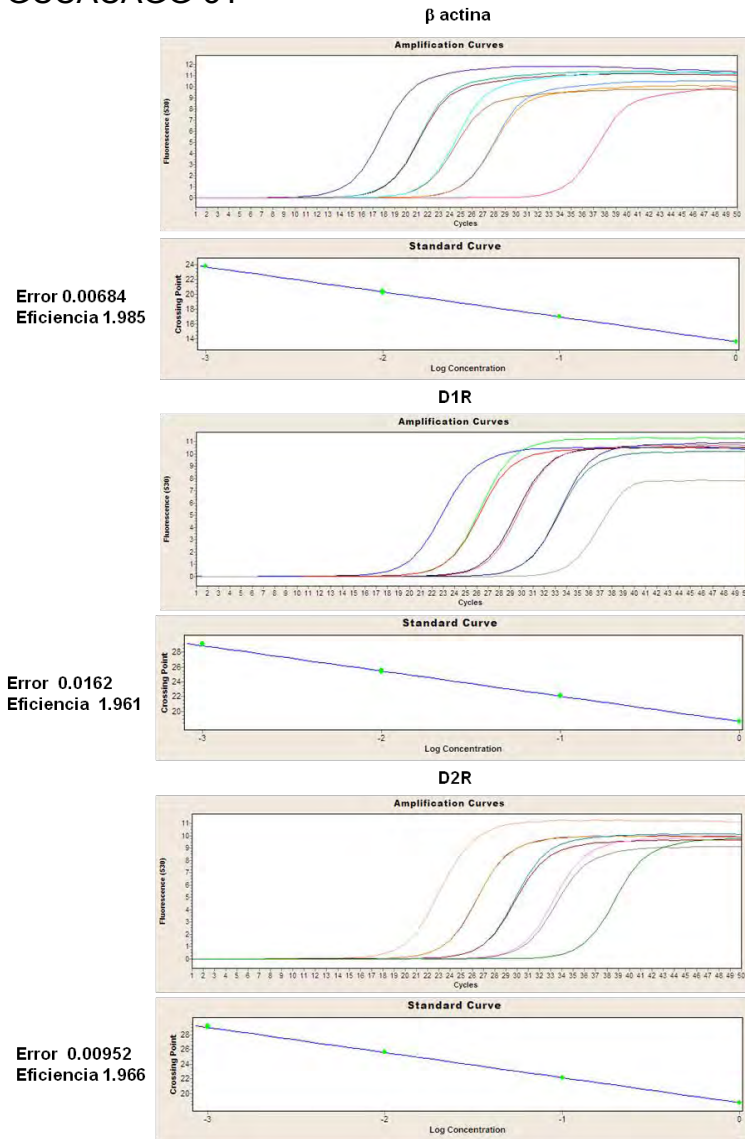


Figura 25. Determinación de la eficiencia de amplificación de β actina, D1R y D2R.

Se muestra la amplificación de diluciones seriales de ADNc obtenido a partir de ARN estriatal (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 y muestra sin ADNc) así como la eficiencia de amplificación obtenida.