



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Vía de Señalización de los Receptores a Dopamina D₂ en
terminales nerviosas del Globo Pálido de rata.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ISAAC HIRAM CABALLERO FLORÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. BENJAMIN FLORÁN GARDUÑO

ASESOR DE TESIS

DR. JOSÉ ÁNGEL ROJAS ZAMORANO



México, D.F., 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a la UNAM por permitirme ser un “Universitario”, cursar mi bachillerato en la Escuela Nacional Preparatoria No. 3 “Justo Sierra” y posteriormente mi licenciatura en la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”; porque ser “Universitario” va mucho más allá de ser solamente el fan de un equipo de futbol. Siempre estaré orgulloso de ser un Químico Farmacéutico Biólogo formado en la UNAM y mejor aún de la FES Zaragoza.

A el Dr. Benjamín Florán Garduño por darme la oportunidad y la confianza de realizar mi trabajo de Servicio Social así como de Tesis Experimental y comenzar una experiencia invaluable dentro de sus proyectos de investigación, en el laboratorio 4 del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

A el ahora ya Dr. Sergio Recillas, por su paciencia, por ser un excelente guía, consejero y maestro, que junto al QFB Francisco Paz, fueron base para el desarrollo experimental tanto de mi proyecto de Servicio Social así como de Tesis. Al igual que Jose Luis y a la señora Chelita equipo técnico del laboratorio cuya participación es clave en los experimentos muchas gracias.

Gracias a mi asesor el Dr. José Ángel Rojas Zamorano por su confianza en el proyecto y apoyo, también por la Invitación al Seminario de la UAM Iztapalapa, sirvió de mucho para saber que puntos debería trabajar más fuerte en mi presentación oral del proyecto.

A mis sinodales la Q.F.I. Estela Valencia Plata, la M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara y el Q.F.B. Enrique Escalera Zúñiga, cuyas aportaciones al proyecto fueron fundamentales para mejorar sustancialmente el escrito de la Tesis.

A TODOS MUCHAS GRACIAS.

“Yo soy el anormal ahora. La normalidad es un concepto mayoritario. Norma de muchos, no de un solo hombre.”

(Soy Leyenda, Richard Matheson)

DEDICATORIA

A mi familia en general (Florán, Caballero, Mera), por siempre cuento con su apoyo incondicional, ya sea de manera directa o indirectamente se encuentran involucrados en todos los aspectos de mi vida, disculpen no particularizar, los quiero a todos.

A René mi Padre y Héroe, amigo de aventuras, mi ejemplo a seguir, estaré ahí siempre para ti, como tu siempre lo has estado para mi. Esto es solo el inicio de lo que haré, por que siempre hay mas cosas que hacer, jamás se termina, así me has enseñado ¡Ni un paso atrás! te amo papá.

A Dolores mi Madre, la mujer que más admiro, manajo de sentimientos que siempre tiene la razón, jamás me alejare tanto como para que me extrañes, te dedico este pequeño escrito por que siempre me alientas para seguir adelante y haces que mis obstáculos parezcan mas pequeños de lo que yo los veo, te amo.

A René Nahúm mi hermano, por que siempre me recuerdas que debo mantener la mirada al frente y los puños bien cerrados, preparando mi siguiente paso, quiero que continúes siendo el mejor ejemplo, nunca será necesario recordarte que cuentas conmigo.

A mis entrañables amigos, Jaime Castañón y Eduardo Villanueva, que a pesar de la brecha abierta por nuestras aspiraciones profesionales, encontramos la manera de mantener la amistad que tenemos desde ya hace varios años, espero sigamos con todos nuestros proyectos multidisciplinarios, ¡hay tiempo para todo! Jaime gracias por tu apoyo con los esquemas de mi presentación quedaron excelentes.

Por supuesto dedicado a los dos primeros contactos humanos en la FES el buen Dany (disaster) Rodríguez y Chucho (distroyer) Parra, carnalitos desde los primeros pasos. A tres tipitas locas que alivianaron los primeros semestres complicados Nayelli Otero, Erika Ramírez y Yenisey Rojas. A mis incansables brothers de aventuras Adrián Neri, Juan(bo) Cornejo, Rodrigo Muñoz seguiremos acampando aunque sea en el Mineral. De la parte medular de la carrera a Miriam Flores, Alexandre Duarte, Sara Gonzalez, Jhonatan Martínez y Karina Mora, amistades invaluables, siempre cercanos. A Dulce Chavez y Mario Torres por estar ahí para pintarnos la barba, vender café, armar los QFÖHEADS y entre otras cosas hacer actividades académicas, les dedico este trabajo por ser personas clave en la parte final del recorrido y durante la carrera.

Para todos ustedes...

“Live Fast, Die Old” (Lemmy Kilmister)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	6
LA DOPAMINA.....	7
<i>BIOSINTESIS DE DOPAMINA.....</i>	<i>7</i>
<i>RECEPTORES A DOPAMINA.</i>	<i>9</i>
LA DOPAMINA Y LOS GANGLIOS BASALES.	10
<i>1) LOS GANGLIOS BASALES GENERALIDADES.....</i>	<i>10</i>
<i>2) CIRCUITOS MOTORES Y LA ACCION DE LA DOPAMINA.....</i>	<i>12</i>
LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES A DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES.	14
<i>1) RECEPTORES D₁.....</i>	<i>14</i>
<i>2) RECEPTORES D₂, D₃ Y D₄.</i>	<i>16</i>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
HIPOTESIS DE TRABAJO.	19
OBJETIVO.	20
OBJETIVOS PARTICULARES.	20
DISEÑO EXPERIMENTAL.	20
MATERIAL.	21
DIAGRAMA DE FLUJO MÉTODO.....	24
MÉTODO.	25
<i>Composición de soluciones Krebs-Henseleit (K-H) y K-H despolarizante (K-H alto K⁺).....</i>	<i>25</i>

<i>Obtención de las rebanadas</i>	25
<i>Liberación de [³H]-GABA</i>	26
RESULTADOS	27
1) Efecto de la activación de receptores D ₂ sobre la liberación de [³ H] GABA.....	27
2) Efecto del bloqueo de la vía Adenilato ciclasa →PKA, sobre inhibición de los receptores D ₂ de la liberación de GABA.	27
3) Efecto del bloqueo de la vía PLC→PKC sobre la inhibición de los receptores D ₂ de la liberación de GABA.	30
4) Efecto del Bloqueo de Canales Ca ²⁺ tipo L sobre la inhibición de la liberación de GABA mediada por receptores D ₂	32
ANÁLISIS DE RESULTADOS	33
CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	33
<i>1.- El tejido cerebral rebanado</i>	33
<i>2.- Captura, liberación y recaptura de GABA</i>	36
<i>3.- Metabolismo del [³H]-GABA</i>	37
<i>4.- Estimulación de la liberación</i>	38
<i>5.- Tratamiento con Reserpina</i>	38
ACTIVAR RECEPTORES D₂ INHIBE LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO	39
LOS RECEPTORES D₂, LA VÍA ADENILATO CICLASA -> PKA Y LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO	39
LOS RECEPTORES D₂, LA VÍA PLC -> PKC -> CANAL Ca²⁺ TIPO L Y LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO	40
CONCLUSION	42
PERSPECTIVAS	42
REFERENCIAS	43

INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más frecuentes y desafortunadamente no se conoce un tratamiento que cure estas, tal es el caso de la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza por una disminución drástica de la Dopamina en los ganglios basales, principalmente en la sustancia nigra, dicha disminución acarrea un desajuste en el circuito motor, cuya actividad es regulada bioquímicamente por neurotransmisores como la Dopamina y el Ácido γ -aminobutírico (GABA). Se sabe que los receptores D_2 controlan la liberación de GABA en las terminales nerviosas de la vía indirecta (estriado-palidal) del circuito motor; el conocer la naturaleza del comportamiento de estos receptores, puede ser clave en la búsqueda de nuevos tratamientos para el desequilibrio neuronal en las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Este proyecto contribuyó a determinar la vía de señalización de los receptores dopaminérgicos del tipo D_2 en la liberación del neurotransmisor GABA en las terminales nerviosas de la vía estriado-palidal, evaluando la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) o la inhibición de la Adenilato ciclasa, que constituyen las opciones por las cuales los receptores de esta familia producen sus efectos y que en estas terminales se desconoce. Se utilizó como modelo de estudio, la liberación de GABA radioactivo en rebanadas de globo pálido de rata. Elaborando preparaciones de rebanadas con las terminales nerviosas de la vía estriado-palidal se incubaron con el neurotransmisor radioactivo, para así cuantificarlo durante la estimulación de su liberación evocada con una solución de alta concentración en K^+ . Las rebanadas fueron expuestas a diferentes fármacos que bloquean las vías de señalización durante la activación de receptores D_2 de manera selectiva, lo cual permitió inferir el probable tipo de señalización de dichos receptores, en estas terminales cerebrales.

LA DOPAMINA

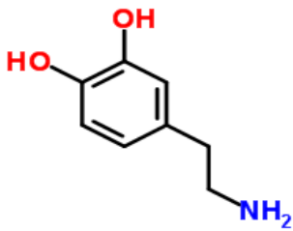


Imagen 1. Molécula de dopamina, catecolamina proveniente de la Tirosina precursora de Adrenalina. La dopamina es responsable de la regulación de diversos procesos neuronales. (imagen tomada de www.chemspider.com)

La dopamina (Imagen 1) forma parte de la familia de las catecolaminas junto con la adrenalina y la noradrenalina, denominadas así por poseer en su estructura al 3,4-dihidroxifenilo o catecol y una cadena lateral etilamino, la dopamina es la última de las catecolaminas a la cual se le descubrió actividad como neurotransmisor en el cerebro de los mamíferos. A mediados de los 50's se consideraba exclusivamente como intermediario de la biosíntesis de adrenalina y noradrenalina a partir de la L-Tirosina. Poco tiempo después Montagu, Carlson y colaboradores al final de la década

de los 50's, encontraron en tejido bovino que la dopamina en el cerebro se encontraba presente en concentraciones equivalentes a la noradrenalina pero con una distribución distinta lo que llevo a estos investigadores suecos a encontrar otro papel biológico de la dopamina; sus estudios demostraron que la mayor cantidad de dopamina en el cerebro se encuentra confinada en los ganglios basales, proponiendo que la dopamina se encuentra relacionada al control motor y que la disminución de dopamina podía ser la causa de los síntomas extrapiramidales del mal del Parkinson.¹

BIOSINTESIS DE DOPAMINA

La vía clásica de la síntesis de la dopamina requiere la actividad de la tirosina-hidroxilasa (TH), que cataliza el primer paso al convertir la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA) y la aminoácido-aromático-descarboxilasa (LAAD) o DOPA descarboxilasa, que cataliza la conversión de la DOPA en Dopamina (Imagen 2). El primer paso de síntesis consiste en la hidroxilación del anillo fenólico del aminoácido tirosina por mediación de la TH. La tirosina puede ser sintetizada a partir de otro aminoácido, la fenilalanina, o bien provenir de la dieta y penetrar en las neuronas por transporte activo.²

La TH es específica de las células catecolaminérgicas y se encuentra en la fracción libre del citoplasma, no en gránulos ni en vesículas; requiere O_2 molecular, Fe^{2+} y el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). La disponibilidad del BH4 repercute en la regulación de la actividad de la TH. La enzima es activada mediante fosforilación, que puede ser provocada por las proteíncinas A y C, y por la dependiente de Ca^{2+} -calmodulina. La descarboxilación de la L-DOPA por parte de la enzima LAAD y su conversión en dopamina se realiza en el citoplasma. Receptores a dopamina presinápticos también modulan la hidroxilación de la TH, estos receptores son activados por la dopamina liberada en la terminal nerviosa, creándose una autoregulación de la síntesis de dopamina.²

La membrana plasmática transportadora de dopamina es un componente único de la terminal dopaminérgica con una importante función fisiológica en la regulación y reciclaje sobre la liberación de dopamina en la hendidura sináptica. El transportador de monoaminas vesicular (VAT) almacena la dopamina en vesículas disminuyendo así la concentración de dopamina citoplasmática y previniendo así su metabolismo por las monoamino-oxidasas (MAO). El VAT modula la concentración de dopamina libre en las terminales nerviosas.²

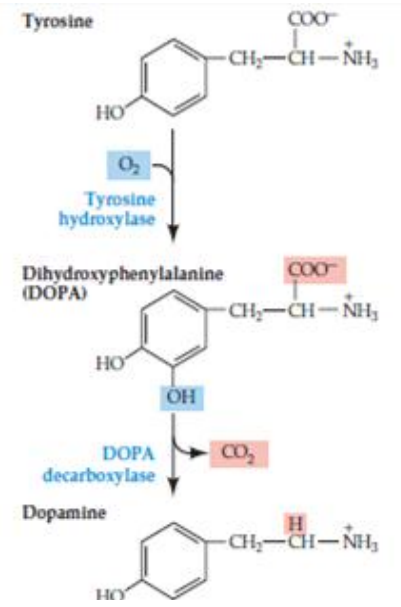
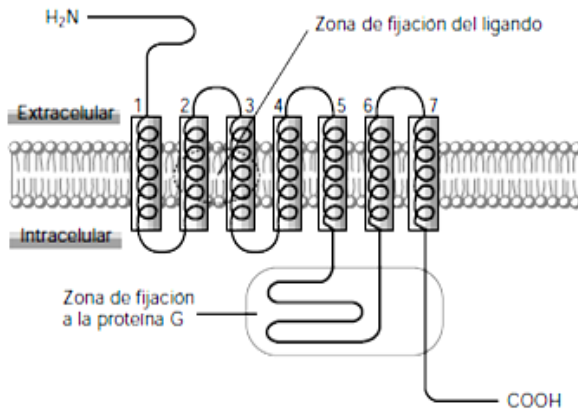


Imagen 2. El primer paso en la síntesis de catecolamina es catalizada por la tirosina hidroxilasa en una reacción que requiere oxígeno como co-sustrato y tetrahidrobiopterina como un cofactor para sintetizar dihidroxifenilalanina (DOPA). Imagen modificada de: Purves D, et all, Neroscience 3ed, 2004)



RECEPTORES A DOPAMINA

Las acciones fisiológicas de la dopamina se encuentran reguladas por 5 subtipos de diferentes receptores de membrana, con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Imagen 3), los cuales se clasifican en la familia *D₁-like* (*D₁*, *D₅*) y la familia *D₂-like* (*D₂*, *D₃*, *D₄*) basados en sus propiedades farmacológicas y bioquímicas. La primera identificación de diferentes subtipos de receptores fue descrita en 1978 por Spano y

Imagen 3. Modelo general de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembranales, entre los dominios 2 y 3 se señala el sitio donde los ligandos interactúan con el receptor. La zona de fijación de la Proteína G consta de varios conjuntos proteicos dejando libre el extremo carboxilo terminal donde se favorecen reacciones de fosforilación y acilación. (imagen tomada de Flórez J, Farmacología Humana 3ed 1997).

colaboradores. Subsecuentemente dos subtipos de receptores denominados *D₁* y *D₂*, fueron clasificados respecto a su efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad de la adenilato ciclasa por Kebabian y Calne en 1979.¹³⁴

El extremo carboxilo terminal de las subfamilias contiene sitios de fosforilación y acilación que se cree se encuentran involucrados en la desensibilización por agonista dependiente del receptor y en la formación de un complejo proteico intracelular cuaternario (IL4). Ligandos dopaminérgicos hacen más fácil discriminar entre receptores de la subfamilia *D₁-like* o *D₂-like* pero entre los miembros de la misma subfamilia no siempre, por ejemplo el antagonista de receptores *D₁* el SCH-23390, o el agonista SKF-38393 poseen una afinidad similar los receptores *D₅*, la selectividad farmacológica de estos compuestos está aún por determinarse en animales vivos, por lo cual la utilización de animales carentes de receptores específicos ayuda a definir la selectividad de compuestos que se ligan a ciertos receptores en particular. Con respecto a los miembros de la familia *D₂-like* hay más fármacos con acciones selectivas particularmente con los receptores *D₃* y *D₄*.³

Cabe resaltar que la expresión de los receptores a Dopamina no es exclusiva del sistema nervioso central como se destaca en este proyecto. Estos receptores desempeñan una actividad importante en el sistema nervioso periférico, por ejemplo a nivel renal regulan el fluido en la nefrona, tubos proximales y el conducto colector, así como el balance electrolítico, el balance de oxido reducción y la presión arterial ⁵. También se encuentran expresados receptores a dopamina en aferentes que llegan al cuerpo carotídeo desde el Nervio petroso, regulando la actividad quimiosensorial en esta zona⁶.

LA DOPAMINA Y LOS GANGLIOS BASALES.

1) LOS GANGLIOS BASALES GENERALIDADES

Los ganglios basales son componentes de un gran circuito segregado que anatómicamente y funcionalmente involucran a la corteza cerebral y al tálamo, tradicionalmente son estudiados a partir de 4 núcleos principales que a su vez tienen subnúcleos (Imagen 4). El Neostriado que en los roedores es un simple núcleo, y en los vertebrados superiores está dividido por la cápsula interna en el núcleo *Caudado* y el *Putamen*. El Globo pálido (GP) que se divide en dos segmentos, globo pálido interno (GPi) equivalente (en términos de aferencias de entrada y salida) al núcleo entopeduncular (EP) en roedores, y el globo pálido externo (GPe) equivalente al globo pálido de los roedores, sin embargo las aferencias de entrada y salida del complejo palidal son funcionalmente distintas. La sustancia negra (SN) se divide en dos sub-núcleos pars compacta (SNc) y pars reticulata (SNr) ubicadas en el mesencéfalo. Ambas partes de la SN presentan aferencias de entrada similares, pero se encuentran grandes diferencias en las conexiones de salida, su composición neuroquímica diferencia a distintos tipos de neuronas. Estas divisiones se conocen como la cara dorsal de los ganglios basales la cual es prioritariamente asociada con las funciones motoras y asociativas. La división ventral incluye al cuarto núcleo básico de los ganglios basales, El Núcleo Subtalámico (STN), así como el ventral pálido (que seguramente incluye el GPi) y las partes medias del STN y SN esta sección se le relaciona principalmente con las funciones límbicas.⁷

En los núcleos caudado y putamen se recibe la mayor parte de aferencias provenientes de diversas áreas y núcleos: fundamentalmente de múltiples áreas de la corteza cerebral como las prefrontales, motoras y somatosensoriales; de los núcleos talámicos intralaminares, de la línea media y de la SNc; entre las restantes aferencias que llegan al estriado se encuentran las que provienen de los núcleos del rafe en el tronco del encéfalo. A su vez, el estriado envía su información mayoritariamente hacia los núcleos ventrales del tálamo y diversas regiones de la corteza cerebral. Esta información se canaliza a través del GPI y SNr (ambas áreas similares en estructura y función), bien directamente o bien indirectamente realizando una conexión intermedia en el STN. Además, la SNr proyecta al tubérculo cuadrigémino superior y a la formación reticular. De este modo, la información motora que nace en áreas corticales es modulada a su paso por el complejo estriado-palidal, merced a sus proyecciones hacia el tálamo y el tronco cerebral, y a las conexiones de estas estructuras con la corteza motora y con la médula espinal.⁷

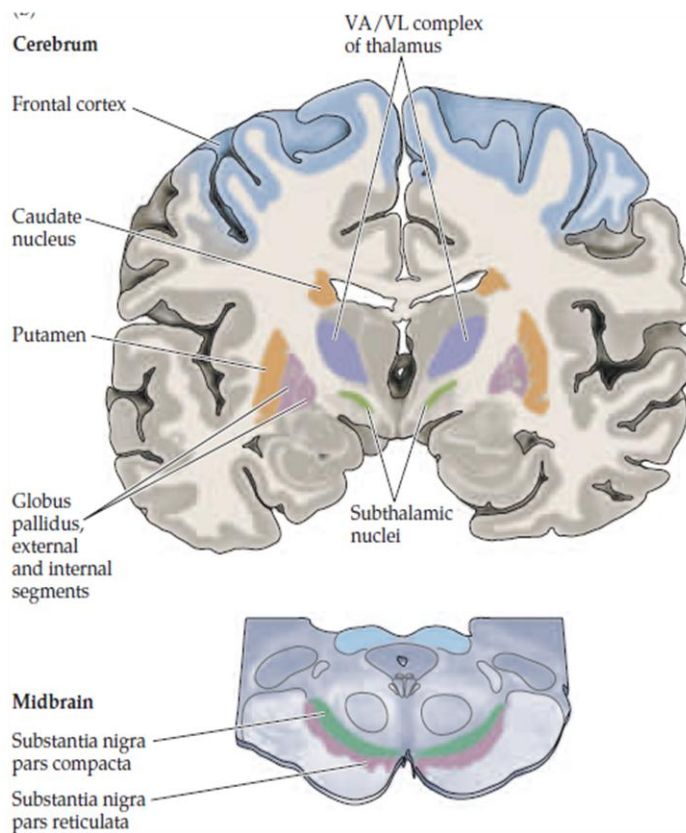


Imagen 4 Corte Sagital ideado para mostrar una aproximación de la ubicación anatómica de los ganglios basales, en la zona denominada como Cerebrum en el esquema, se encuentran coloreados la Corteza frontal, el Estriado marcando por separado las porciones Caudado y Putamen, El tálamo haciendo énfasis en su complejo Lateral Ventral (VL) y Anterior Ventral (VA), el Globo Pálido interno y externo son apenas diferenciados entre sí en color violeta, EL núcleo subtalámico abajo del Tálamo iluminado en color verde. En la zona denominada Midbrain encontramos a la Sustancia marcada en color verde la pars compact y en morado pars reticulata. (imagen tomada de: Purves D, et all, Neroscience 3ed, 2004)

2) CIRCUITOS MOTORES Y LA ACCION DE LA DOPAMINA.

El “circuito motor” tiene origen en las áreas de la corteza frontal, después involucra porciones motoras del estriado, GPe, STN, GPi, SNr y al tálamo regresando a la corteza frontal. Los circuitos asociativos y límbicos se originan desde la corteza prefrontal asociativa y límbica y envuelve áreas relacionadas a los ganglios basales y al tálamo que no se encuentran relacionadas al circuito motor. Si bien se cree que el circuito motor está

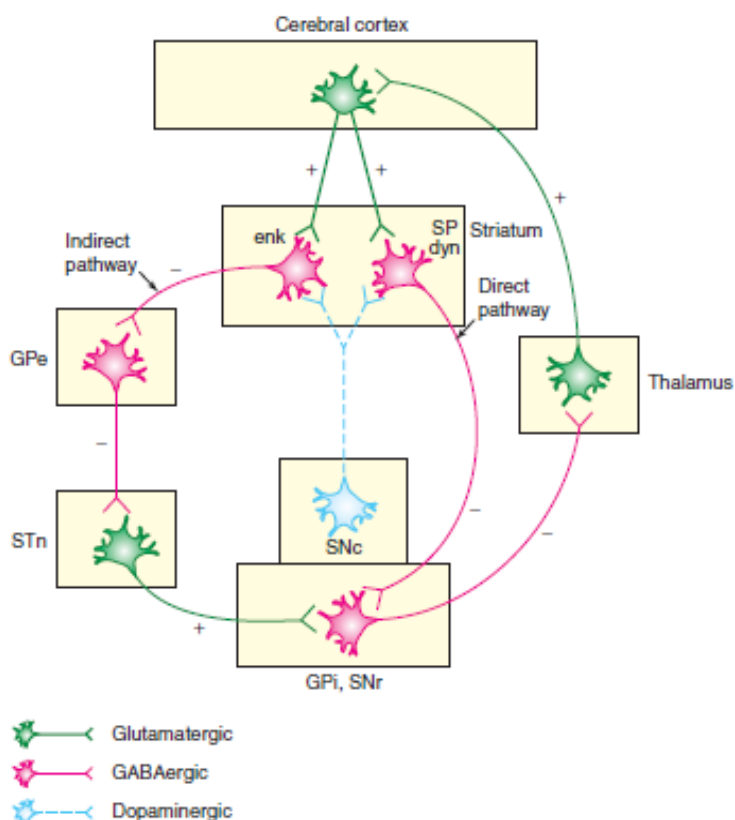


Imagen. 5, Circuito motor; Vías directa e indirecta de los ganglios basales. De manera muy general se ilustra a la vía directa de carácter inhibitorio de los denominados núcleos de salida ilustrados como un solo ente en el esquema, al igual encontramos señalada el curso de la vía indirecta, la cual es de carácter excitador en los núcleos de salida, las cuales se considera clásicamente que funcionan de manera paralela con sus diferentes cambios en su actividad. Principalmente se involucran al glutamato y al GABA como los responsables de la comunicación en el circuito de los ganglios basales, pero se considera a la dopamina como regulador de este sistema, partiendo de su liberación desde la sustancia nigra pars compacta hacia el Estriado. (imagen tomada de: Nestler, E, Hyman, S, Malenka, R, Molecular Neuropharmacology a foundation for Clinical Neuroscience. 2 ed. 2009)

involucrado con el control del movimiento, el circuito asociativo seguramente tiene un papel en el control de las funciones de ejecución y el circuito límbico en el control de emociones y motivación. Disfunción en elementos de estos circuitos puede contribuir a distintas enfermedades desde las clásicas del movimiento como la enfermedad de Parkinson (Parkinson’s disease PD), hasta condiciones neuropsiquiátricas, como el síndrome de Tourette o las adicciones.⁸

La anatomía individual de las conexiones en estos circuitos ha sido ampliamente descrita. Dentro de los ganglios basales, el

Estriado y el STN sirven como estaciones de entrada así como

en el GPi y en la SNr sirven como estaciones de salida. Aferentes glutamatérgicas desde la corteza y el tálamo proyectan hacia al Estriado y al STN de manera topográficamente organizada. Las entradas y salidas nucleares de los ganglios basales son conectadas a través de dos vías: la vía monosináptica GABAérgica directa y la vía polisináptica indirecta. La vía indirecta involucra las proyecciones GABAérgicas desde el estriado hacia el GPi y desde el GPe hacia el STN, de igual manera las proyecciones glutamatérgicas desde el STN al GPe, GPi y Snr. De manera muy básica, la polaridad de las conexiones dentro de las vías directa e indirecta se opone una a otra. Con la activación de neuronas estriatales de la vía directa predomina un efecto inhibitorio sobre la actividad en GPi / SNr, mientras que la activación de la vía indirecta posee un efecto excitatorio (Imagen 5). Este esquema es muy simplista, sin embargo ambas vías pueden presentar patrones de disparo independientes de la tasa de disparo. El GPi y la SNr envían proyecciones GABAérgicas topográficamente organizadas hacia el tálamo y el tronco cerebral. Las salidas del circuito motor del GPi y la SNr alcanza la porción anterior del núcleo ventrolateral talámico (VL_a), que luego proyectan de regreso a las zonas motoras de la corteza frontal (Imagen 5).⁷

Desde hace algunas décadas se ha sabido que la dopamina es un neurotransmisor presente en altas concentraciones en los ganglios basales. El suministro de dopamina en estas estructuras se origina en los núcleos dopaminérgicos del cerebro medio, la SNc y el área ventral tegmental (VTA). Es en el estriado donde destaca la liberación de dopamina en los ganglios basales, influenciando el balance en las vías directa e indirecta por medio de los diferentes tipos de receptores. Los receptores *D₁-like* son encontrados en neuronas estriatales donde comienza la vía directa, al igual encontramos receptores *D₂-like* en neuronas estriatales donde comienza la vía indirecta.⁷

La activación de receptores *D₁-like* en neuronas de la vía directa facilitan la transmisión corteza-estriado, mientras que la activación de receptores *D₂-like* en neuronas de la vía indirecta, pareciera que reducen dicha transmisión. De acuerdo con los modelos tradicionales de los ganglios basales, la dopamina mediada por el incremento de la

actividad de la vía directa, que en conjunto media una reducción de la actividad en la red excitadora de la vía indirecta, lo que conlleva a la disminución de la actividad neuronal Gpi/SNr, actuando así para desinhibir las proyecciones tálamo-corticales. Además de la regulación de la transmisión a lo largo de las vías directa e indirecta, la liberación estriatal de dopamina se ve implicada en la modulación del aprendizaje y en la plasticidad neuronal a causa de los procesos tales como depresión a largo plazo (LTD long-term depression) y potenciación a largo plazo (LTP long-term potentiation), actuando en las sinapsis glutamatérgicas.⁷

La duración de la acción y difusión de la dopamina es hasta cierto punto regulada por la recaptura mediada del transportador de dopamina (DAT). Estudios en roedores, han demostrado que concentraciones en rangos de eliminación de DAT y DA son distintos entre las regiones estriatales, con el gradiente dorso ventral. Tomando la organización topográfica del estriado, como sus diferentes efectos fisiológicos, y la importancia de la dopamina en dominios de comportamiento. Por instancia, datos fisiológicos indican que el curso temporal de la señalización de dopamina puede ser determinada por un patrón de interacción dopamina-glutamato en las diferentes áreas del estriado.⁷

LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES A DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES

1) RECEPTORES D₁

La primera evidencia bioquímica de un receptor a dopamina fue identificada en 1972, con la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa y la acumulación de AMP cíclico en la retina y en el núcleo neostriado de rata. Durante la activación proteínas $G\alpha_s$ y específicamente de $G\alpha_{olf}$ se unen primero al dominio C₂ citosólico de la adenilato ciclasa lo que conlleva a la que juntos el dominio C₁ y el C₂, mejoren la eficiencia catálitica de la enzima. La adenilato ciclasa cataliza la conversión de ATP a AMP cíclico, el cual se une la porción reguladora de la holoenzima Proteína cinasa A (PKA) para desinhibir sus subunidades catalíticas. Se ha demostrado que en el tejido neostriado de roedores predomina la adenilato ciclasa subtipo 5, lo cual nos lleva a que la vía de señalización en

este núcleo es Receptor $D_1 \rightarrow G\alpha_{\text{off}} \rightarrow \text{PKA}$. La PKA fosforila un número importante de proteínas que se encuentran ligadas a varios tipos de transducción, por ejemplo fosforila a fosfoproteína reguladora de Dopamina y AMP cíclico (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32), lo cual puede repercutir en una inhibición de la protein fosfata-1 (PP1) con un efecto positivo en canales iónicos de Na^+ y Ca^{2+} (Imagen 6).⁹

La señalización de los receptores D_1 -like también se da por la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) la cual modula la movilización de Ca^{2+} intracelular, por medio de la vía de los fosfoinosítidos, comenzando con la subunidad $G\alpha_q$ de tal modo que, la vía es Receptor $D_1 \rightarrow G\alpha_q \rightarrow \text{PLC}$, la cual metaboliza el fosfatidil-inositol (PI), el fosfatidinositol 4- fosfato (PIP) y el fosfatidinositol 4,5 difosfato (PIP₂). La hidrólisis de PIP₂ produce segundo mensajeros, diacilglicerol (DAG), los cuales contribuyen a la activación de la proteína quinasa C (PKC) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) IP₃ que se une a receptores intracelulares algunos localizados en el retículo endoplásmico para estimular la liberación de Ca^{2+} almacenado (Imagen 7).^{9,10}

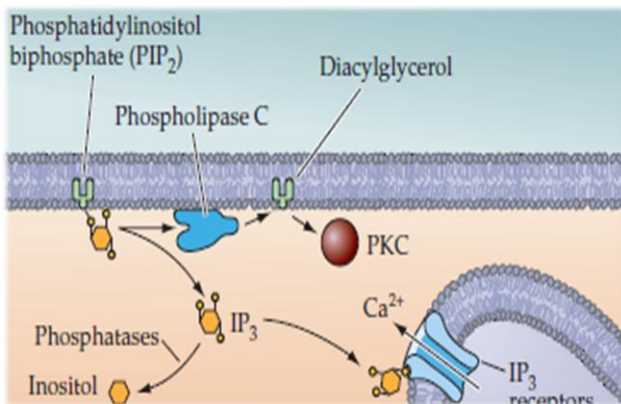


Imagen 7. Los receptores D_1 a través de su acople a proteínas del tipo G_q pueden activar a la fosfolipasa C ilustrada de color azul en la imagen, esta lipasa promueve la formación de IP₃ el cual puede ligarse a sus receptores en el retículo endoplásmico y estimula la liberación de Ca^{2+} , simultáneamente el activar la fosfolipasa C se desprende diacilglicerol el cual activa a la PKC otra cinasa que puede tener efecto sobre canales de calcio tipo N. (imagen tomada de: Purves D, et all, Neroscience 3ed, 2004)

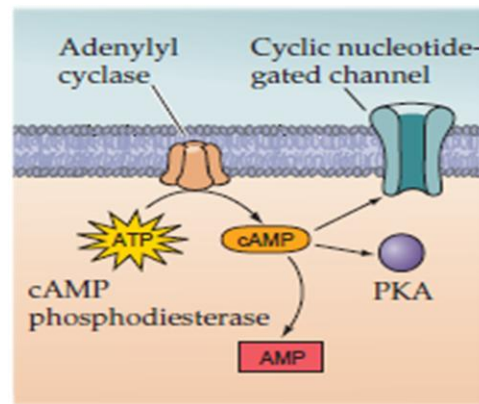


Imagen 6. Activación de la AC unido en la membrana por parte de los receptores D_1 acoplados a proteínas G_s catalizan la formación de AMPc a partir de ATP. El AMPc ilustrado de canal naranja puede tener efecto sobre canales, y activar la proteincinasa A (PKA) la cual puede fosforilar otras enzimas como la Tirosin hidroxilasa (TH). (imagen tomada de: Purves D, et all, Neroscience 3ed, 2004).

2) RECEPTORES D₂, D₃ Y D₄

Para los receptores *D₂-like* la primera vía de señalización identificada fue la ruta de inhibición de la acumulación de AMP cíclico, que junto con la evidencia de la falta de respuesta a fármacos antipsicóticos, se presumió que esta vía de señalización contribuye a los efectos de la estimulación del receptor D₂ en la actividad locomotora; actualmente se sabe que los receptores D₂ Y D₄ inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (img. 8) en varias líneas celulares y tejidos, pero esta inhibición por medio del receptor D₃ es más débil y usualmente indetectable, lo cual es interesante dado que este tipo de receptores (*D₂-like*) inhibe fuertemente la adenilato ciclasa tipo 5.⁹

Se presume que la inhibición de la adenilato ciclasa esta mediada por las proteínas Gi/o, por que la adenilato ciclasa tipo 5 es directamente inhibida por G_{ai} y es insensible a la porción Gβγ. G_{ai} se une al dominio citosólico C₁ en su forma G_{ai}-inhibidora de adenilato ciclasa y reduce la interacción de los dominios C₁/C₂. Esta vía de inhibición de la adenilato ciclasa puede ser expresada para actuar en oposición de los agentes que estimulan la adenilato ciclasa, decreciendo la fosforilación de substratos de PKA, ejemplo de esto es que la estimulación de receptores *D₂-like* disminuyen la estimulación de PKA por fosforilar a DARPP-32 en Thr 34 e incrementa la fosforilación en Thr75 lo que conlleva a la inhibición de la Na²⁺ K⁺ ATPasa en neuronas neoestriatales. También es probable que la inhibición de la adenilato ciclasa sea el mecanismo del receptor D₄ inductor de la inhibición de las corrientes de GABA en globo pálido de rata, posiblemente por la disminución de la fosforilación de PKA dependiente en la subunidad 3 del receptor de GABA A.⁹

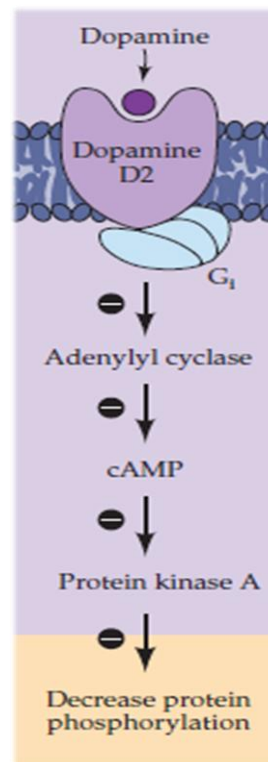


Imagen 8. Estimular los Receptores D₂ con dopamina naturalmente acoplados a una proteína Gi, provocan una disminución en la activación de la Adenilato ciclasa, que repercute en una disminución de la formación de AMPc lo que provoca una disminución en la actividad de PKA y por lo tanto en una menor fosforilación de proteínas dependientes de esta cinasa (imagen tomada de: Purves D, et all, Neuroscience 3ed, 2004).

Es muy común que receptores acoplados a proteínas G i/o, como los Receptores *D₂-like*, modulen algunas vías de señalización además de la adenilato ciclasa, incluyendo fosfolipasas, canales iónicos, MAP quinasas, y transportadores Na⁺/H⁺. Algunas de estas vías de señalización son reguladas por las subunidades Gβγ que son liberadas por la activación de las proteínas Gαi/o. Prueba de esto es el efecto permisivo de Gβγ sobre las adenilato ciclasa tipo 2 y 4, de modo que la estimulación sobre otros activadores como la Gαs y PKC es mejorado en presencia de Gβγ, la cual se une a residuos en numerosos dominios citosólicos para adenilato ciclasa 2.⁹

Receptores *D₂* en neuronas espinosas medianas en el núcleo neostriado, activan Gβγ citosólica que estimula a la fosfolipasa C, PLC β1, causando que el inositol trifosfato induzca la movilización de calcio que activa la proteínas dependientes de calcio como la calciuwerina fosfatasa, para finalizar con la reducción de la corriente de Ca²⁺ tipo L. Esta vía puede contribuir a la regulación de PKA- independiente de la fosforilación DARP-32 por medio de receptores *D₂-like*. Se sabe que la estimulación de receptores *D₂-like* influye en los flujos de K⁺ por medio de la porción Gβγ con una mayor potencia en comparación de la inhibición de la adenilato ciclasa dependiente de Gαi. De manera opuesta a los receptores *D₁*, los *D₂* disminuyen la estimulación de excitación celular mediante el incremento de los flujos en los canales de K⁺; dichos canales son modulados por la dopamina en neuronas que expresan receptores *D₂-like* en el área nigroestriatal y se ha observado que el efecto estimulador de receptores *D₂* en el flujo de salida de potasio dependiente de voltaje aparece dependiendo de la zona de cerebral examinada.⁹

Los receptores *D₂-like* disminuyen la actividad de los canales de calcio tipo L, N y P/Q por medio de la sensibilización de proteínas G con toxina pertusis. Receptores *D₂* en interneuronas (colinérgicas) de neostriado inhiben a canales de Ca²⁺ tipo N por una membrana que delimita la vía, que probablemente involucre Gβγ. Las subunidades Gβγ tienen como blanco las regiones I-II de enganche y/o el COOH terminal de la subunidad de estos canales de Ca²⁺ que disminuyen la cantidad de corriente acarreada, por ejemplo en neuronas espinosas medianas disminuyen los flujos de Ca²⁺ tipo L. Esta respuesta

también es mediada por subunidades $G\beta\gamma$, pero involucra a la subunidad $G\beta\gamma$ con la fosfolipasa C, movilización de Ca^{2+} y la activación de la calcineurina (PP2B). También se ha comprobado que se puede activar la PKC a consecuencia de la activación de la PLC esta proteína cinasa se activa a partir del DAG desprendido durante la formación del IP3, esto puede mediar la actividad de canales de Calcio tipo N en neuronas estriatales⁹. Los receptores D_2 por medio de $G\beta\gamma$ estimulan MAP cinasas, como las isoenzimas cinasas de regulación de señal extracelular (ERK) y la proteína quinada activada por estrés /amino cinasa terminal Jun (SAPK/JNK), las cuales transmiten señales desde una variedad de estímulos extracelulares hacia el núcleo, participando en la proliferación, diferenciación y supervivencia.⁹

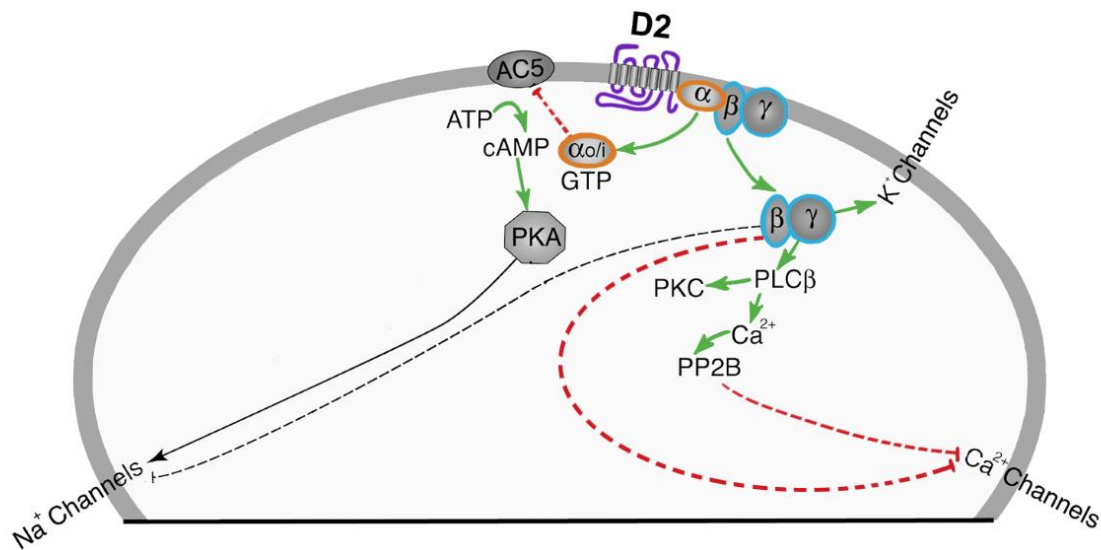


Imagen 9. La estimulación de los receptores D_2 poseen una muy variada gama de efectores como se resume en la imagen anterior, donde las vías de carácter activador se encuentran indicados en línea continua y finalizan con una flecha, las vías de carácter inhibitor se encuentran en línea punteada y finalizan en una barra que interrumpe la línea. En la imagen se destaca con colores la actividad que hasta ahora ha sido reportada por parte de los receptores D_2 y que son de interés en este trabajo, de color naranja se encuentra señalado la subunidad $G\alpha_i$ destacando de color verde que su estimulación inhibe la actividad de la Adenilato Ciclasa 5 (AC5) en color rojo, la cual de ser activada catalizaría la formación de AMPc (flechas color verde) y por lo tanto la estimulación de la PKA la cual podría tener un efecto final sobre canales de Na^+ . De la misma forma la sub unidad $G\beta\gamma$ en color azul estimula la PLC la cual puede activar a la PKC y esta aunque no esta señalada puede mediar la actividad en canales de Ca^{2+} tipo N, por otro lado la sub unidad $G\beta\gamma$ puede estimular la formación de IP3 para estimular la salida de los reservorios de Ca^{2+} y estos activar a otras proteínas como la PP2B (calcineurina) para ejercer un efecto bloqueador en canales de Ca^{2+} o inclusive tener un efecto directo sobre dichos canales. Imagen modificada de: Neve. K. A, Seamans. J.K. Trantham-Davidson. H, Dopamine Receptor Signaling, Journal of receptors and signal transduction, Vol. 24, No. 3, pp. 165–205, 2004

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunas de las enfermedades de los ganglios basales cursan con alteración morfológica o funcional de la vía dopaminérgica nigroestriatal, tal es el caso de la enfermedad de Parkinson. Para poder identificar estas alteraciones, en los últimos años se ha hecho fundamental conocer las vías de señalización de los receptores dopaminérgicos para comprender los efectos de los mismos en condiciones normales y patológicas.

Se sabe que los receptores a dopamina del tipo D_2 al ser activados pueden señalar bioquímicamente para desencadenar distintos procesos, uno de estos es el control de la liberación de GABA, lo que en condiciones patológicas resulta alterado incrementándose de manera considerable en las terminales nerviosas de las neuronas de la vía indirecta (estriado-palidales), este hecho hace necesario conocer dicha vía en detalle y en qué grado su modificación repercute en la liberación del GABA, lo que tiene efectos en el circuito de los ganglios basales, los cuales son encargados de la regulación del control motor.

Desde hace algunas décadas, las preparaciones *in vitro* de tejido cerebral, resultan una gran herramienta que permite llevar a cabo distintas pruebas farmacológicas, las cuales pueden aportar gran información sobre el comportamiento bioquímico de estas vías de señalización neuronal.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Si la activación de los receptores D_2 inhibe la liberación de GABA en el Globo Pálido a través de la vía $PLC \rightarrow PKC \rightarrow \text{Canal de } Ca^{2+}$; entonces el bloqueo farmacológico de la PLC, PKC y el canal de Ca^{2+} prevendrá el efecto de la activación de los receptores D_2 sobre la liberación de GABA.

OBJETIVO.

Determinar la vía de señalización del receptor D₂ en el control de la liberación de GABA en las terminales nerviosas del Globo Pálido.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de la activación de los receptores D₂ en la liberación de GABA radiactivo en rebanadas de Globo Pálido de rata.
2. Analizar la participación de la adenilil ciclasa a través de su bloqueo en el efecto de la activación de los receptores D₂ sobre la liberación de GABA.
3. Establecer la participación de la Protein cinasa A (PKA) a través de su bloqueo en el efecto de la activación de los receptores D₂ sobre la liberación de GABA.
4. Identificar la participación de la fosfolipasa C (PLC) a través de su bloqueo en el efecto de la activación de los receptores D₂ sobre la liberación de GABA.
5. Estudiar la participación de la Protein cinasa C PKC a través de su bloqueo en el efecto de la activación de los receptores D₂ sobre la liberación de GABA.
6. Relacionar la participación de los canales de Ca²⁺ tipo L a través de su bloqueo en el efecto de la activación de los receptores D₂ sobre la liberación de GABA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- 1) Tipo de estudio. Experimental longitudinal.
- 2) Población de estudio. Rebanadas de cerebro que contiene el Globo Pálido, provenientes de ratas macho Wistar de 229 g de peso. Provenientes del bioterio del CINVESTAV mantenidas en condiciones adecuadas de luz, temperatura, alimentación e hidratación de acuerdo a las normas oficiales y los comités de ética correspondiente.
- 3) Criterios de inclusión, animales sanos entre los pesos establecidos. Exclusión aquellos que tengan alguna alteración física notables a la vista del investigador o

no cumplen con los criterios de inclusión. Eliminación. Aquellos animales excluidos.

- 4) Variables. Se estudiará la liberación de GABA radioactivo previamente capturado como variable dependiente de la fracción de liberación o tiempo de colección de muestras de la liberación. Se diseñaran grupos control y experimental sometidos a las drogas a estudiar, agonistas y antagonistas farmacológicos de los receptores D2 a dopamina, y bloqueadores de la cinasas: PKC, PKA, adenilil ciclasa y PLC.

MATERIAL

MATERIAL DE VIDRIO.

- Vasos de precipitados, 40, 100, 250, 500, 1000 mL
- Pipeta de vidrio 10 mL
- Porta objetos
- Viales 20 ml
- Tubos de ensayo 120 x 16
- Probetas 25, 50, 100, 500, 1000mL
- Caja petri
- Pipetas Pasteur

MATERIAL

- Jeringa 1 ml
- Aguja para jeringa
- Tijeras Grandes
- Bisturí
- Sacabocados
- Hojillas de doble filo (Navajas Gillete)
- Puntas para pipetas automáticas
- Gradilla para viales
- Manguera de látex con piedras difusoras
- Manguera de latex
- Guantes de látex
- Pincel
- Caja de unicel
- Bulbos para pipeta
- Tapones para viales
- Marcador indeleble
- Cinta adhesiva
- Papel
- Bidón con dispensador automático

REACTIVOS

- NaCl. Cloruro de Sodio (Sodium Chloride), J.T. Baker.
- KCl. Cloruro de Potasio (Potassium Chloride), J.T. Baker.
- MgSO₄. Sulfato de Magnesio (Magnesium Sulfate), J.T. Baker.
- KH₂PO₄. Fosfato Ácido de Potasio, cristal, (Potassium Dihydrogen Phosphate), J.T. Baker.
- CaCl₂. Cloruro de Calcio anhidro, Granular, (Calcium Chloride Anhydrous), J.T. Baker.
- NaHCO₃. Bicarbonato de Sodio (Sodium Hydrogen Carbonate), J.T. Baker.
- Glucosa. HOCH₂CH(CHOH)₄O, (D(+)-Glucose, Anhydrous), J.T. Baker.
- Ácido nípecótico. C₆H₁₁NO₂. Sigma –Aldrich.
- Ácido aminooxiacético. O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride. Sigma-Aldrich.
- **Reserpina**. C₃₃H₄₀N₂O₉ (Reserpine), Sigma-Aldrich.
- **(S)-(-)-Sulpiride**. (S)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-methoxybenzamide, Levosulpiride.. Sigma- Aldrich.
- **Quinpirole**. trans-(-)-(4aR)-4,4a,5,6,7,8,8a,9-Octahidro-5-propil-1H-pirazolo[3,4-g]quinolina monohidrocloride ((-)-Quinpirol hidrocloride). Sigma-Aldrich.
- **NKY-80**. 2-Amino-7-(2-furanyl)-7,8-dihidro-5(6H)-quinazolinone. Calbiochem
- **H-89**. N-[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propen-1-yl]amino]ethyl]-5-Isoquinolinesulfonamide dihydrochloride. Sigma-Aldrich.
- **U-73122**. 1-[6-[[[(17β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione. Sigma-Aldrich.
- **Gö-6983**. 3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione. Sigma-Aldrich.
- **Nifedipino**. Dimethyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihidro-3,5-pyridinedicarboxylate. Tocris.
- [³H] γ-Aminobutyric acid . [³H]-**GABA**. Perkin Elmer.

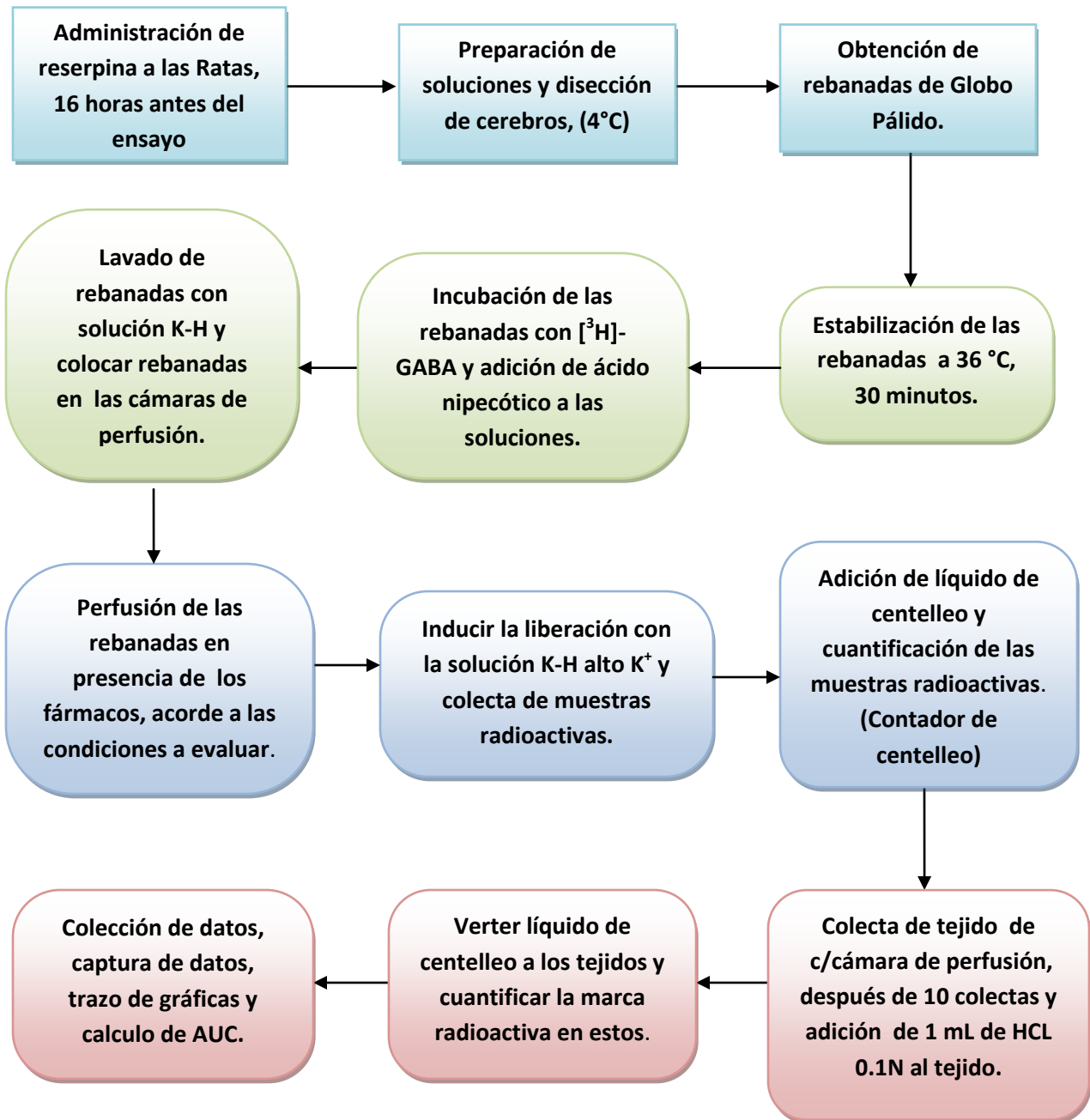
Instrumentos y Equipos B

- Balanza Analítica OHAUS Analytical Plus mod .AP2500.
- Bomba peristáltica multicanal Brandel Inc. Gaithersburg, MD, USA.
- Colector LKB BROMMA mod. 2070 Ultrorac II.
- Contador de centelleo BECKMAN COULTER LS 6500.
- Vibrátomo Campden Instruments mod. MA 752.
- Cámaras de perfusión con mangueras.
- Baño de agua TORRERO mod. BMF.
- Termómetro inmersión parcial -10°C – 150 °C .
- Pipetas automáticas pipetman Gilson (200-1000 µL, 20-200µL, 2-10 µL, 0.1-2 µL).

ANIMALES.

Ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso entre 200 – 220 g, las cuales suministradas por La Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN/Fisiología). Institución bajo la Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

DIAGRAMA DE FLUJO, MÉTODO



MÉTODO

Composición de soluciones Krebs-Henseleit (K-H) y K-H despolarizante (K-H alto K⁺).

La solución de Krebs Henseleit, está compuesta por NaCl 118.25 mM; KCl 1.75mM; CaCl₂ 2 mM; MgSO₄ 1mM; KH₂PO₄ 1.25mM; NaHCO₃ 25mM; glucosa 10 mM; ácido aminooxiacético 0.01 μM (se adiciona para evitar la degradación de la marca radioactiva de [³H]-GABA inhibiendo la GABA transaminasa). La cual es equilibrada con CO₂ al 5% en O₂ a 36 °C. La solución despolarizante debe contener una concentración mayor de KCl. La composición final del la solución de K-H despolarizante es NaCl 106.25 mM; KCl 21 .76 mM; KH₂PO₄ 1.25mM; MgSO₄ 1mM; CaCl₂ 2mM; NaHCO₃ 25mM; glucosa 10 mM; ácido aminooxiacético 10 μM. Ambas soluciones contienen ácido nípecóico a una concentración 10 μM.¹²⁻¹⁵

Obtención de las rebanadas

Se administró a cada rata una dosis 10 mg/kg de reserpina vía subcutánea, 16 horas antes de sacrificarlas, con el fin de depletar los niveles de Dopamina en las terminales nerviosas nigropalidales. Se sacrificó a cada rata por dislocación cervical, después fue disecado el cerebro lo más rápido posible para pegarlo con cianoacrilato en una caja Petri con hielo de solución K-H, la caja fue adaptada al vibrátomo para obtener rebanadas de 300 μm de ancho, por medio de cortes coronales; las rebanadas fueron colocadas en un portaobjetos para realizar la microdissección del Globo Pálido, en un microscopio estereoscópico manteniendo el cerebro en solución de Krebs-Henseleit a 4°C, luego de la disección y durante la obtención de las rebanadas, estas fueron recolectadas en un vial con solución fresca K-H a 4°C , una vez obtenido el mayor número posible de muestras, se realizó un cambio de la solución de K-H a 4°C por una nueva a 36 °C para poner a estabilizar en un baño de agua a esta temperatura durante 30 minutos con burbujeo de CO₂ al 5% en O₂.¹²⁻¹⁵

Liberación de [³H]-GABA

Posteriormente se incubaron las rebanadas con una solución fresca de K-H con 2×10^{-8} M de GABA tritiado [³H]-GABA (50-60 Ci/mmol marca radioactiva) durante 30 min en un baño de agua a 36 °C, transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con la solución de K-H para eliminar el exceso de marca radioactiva, a la solución K-H se le añadió ácido nítrico a una concentración final de 10 μM para disminuir la recaptura del GABA desde antes de la perfusión. Las rebanadas se colocaron aleatoriamente en las cámaras del sistema de perfusión para perfundirlas con la bomba multicanal peristáltica con una velocidad de 0.5 ml/min. Se mantuvo la temperatura de las soluciones de perfusión con un baño en un rango de 37-38 °C para que cuando esta llegase a las cámaras se mantuviese a una temperatura entre los 36 y 37 °C. Durante la perfusión las rebanadas fueron expuestas a los fármacos de acuerdo al efecto a evaluar y se colectaron fracciones de 2ml. La liberación del [³H]-GABA marcado radiactivamente se indujo por la perfusión continua con la solución K-H alto K⁺. Al final del experimento se recolectó el tejido de cámara por separado y se extrajo el remanente radioactivo en el tejido con HCl 0.1 N. La radioactividad se cuantificó en cada muestra por centelleo líquido en un tiempo de 3 min por vial. Se calculó la fracción de la liberación como el cociente de la cantidad de radioactividad de cada muestra entre la radioactividad contenida en el tejido al momento de tomar la muestra. Con la siguiente fórmula.¹²⁻¹⁵

————— Donde: **F.R. = fracción liberada.**
R.P.F.= Radioactividad presente en la muestra.
R.P.T.= Radioactividad presente en el tejido.

El efecto de los fármacos sobre la liberación de [³H]-GABA se expresa como el área bajo la curva (AUC), de las curvas de liberación fraccional. Con las AUC de cada serie experimental se realizó un ANOVA de una vía, así como una comparación de medias con la prueba de Tuckey, este análisis se llevó a cabo con ayuda del programa GraphPad Prism 5.02 (©1992-2009 GraphPad Software, Inc).

RESULTADOS

1) Efecto de la activación y bloqueo de receptores D₂, sobre la liberación de [³H] GABA.

De acuerdo a nuestros objetivos quisimos primero evaluar el efecto de la activación de los receptores D₂ sobre la liberación de GABA. Se inicio con experimentos de liberación de [³H]-GABA utilizando Quinpirol [10μM] (agonista selectivo) ¹⁶ y Sulpiride [10μM] (antagonista selectivo) ¹⁷ proponiendo 4 grupos que evalúan 4 condiciones, denominadas por el o los fármacos utilizados en ellas. La condición control donde no se administra ningún fármaco, otra con Quinpirol, la tercera con Sulpiride y la última con Quinpirol + Sulpiride (Fig. 1). Donde se observó que el efecto despolarizante provocado por la solución de alto K⁺ en todos los grupos, es menor en las rebanadas sometidas a Quinpirol (Fig. 1 A), es decir hay menos liberación de neurotransmisor en este grupo. Calculando el AUC relativa y haciendo un gráfico de barras (Fig. 1 B), podemos observar que la condición con Quinpirol disminuye la liberación significativamente en comparación con la condición control (**AUC relativa; Control 4.110 ± 0.312 vs Quinpirol 2.495 ± 0.224, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**). Este efecto se ve prevenido por el Sulpiride (**AUC relativa; Quinpirol 2.495 ± 0.224 vs Quinpirol + Sulpiride 3.978 ± 0.261, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**), aunque el Sulpiride no incremento la liberación [³H] GABA de manera significativa (**AUC relativa; Control 4.110 ± 0.312 vs Sulpiride 4.490 ± 0.218, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**).

2) Efecto del bloqueo de la vía Adenilato ciclasa →PKA, sobre inhibición de los receptores D₂ de la liberación de GABA.

Posteriormente se comenzó una serie de experimentos de liberación de GABA evaluando el bloqueo de la Adenilato ciclasa 5 con NKY-80 [10μM], un bloqueador selectivo de esta enzima ¹⁸. Para esto se trabajó nuevamente con Quinpirol [10μM] y 4 condiciones. Control, Quinpirol, NKY-80, NKY-80 + Quinpirol (Fig. 2). Se observó que el efecto en la liberación de GABA del NKY-80 no es diferente con la condición Control (**AUC relativa; Control 3.820 ± 0.4244 vs NKY-80 4.103 ± 0.5835, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**) (Fig. 2 D) y que el Quinpirol es capaz de disminuir la liberación de GABA aun en presencia de NKY-80

(AUC relativa; *Quinpirol* 2.337 ± 0.1342 vs *Quinpirol + NKY-80* 1.983 ± 0.1667 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey).

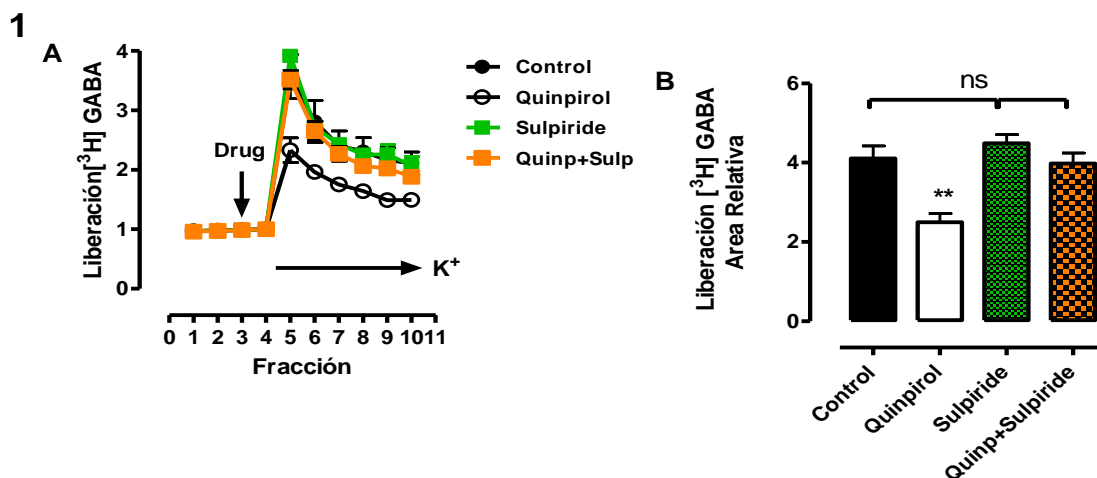


FIG 1. A, Gráfica de fracción colectada vs liberación de [³H] GABA, Quinpirol [10μM], Sulpiride [10μM] en la fracción 5 llega al tejido la solución despolarizante y es muy claro el incremento en la liberación del neurotransmisor. **B**, Gráfico de barras del AUC relativa. Quinpirol disminuye la liberación (AUC relativa; Control 4.110 ± 0.312 vs Quinpirol 2.495 ± 0.224 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3) sulpiride previene el efecto del Quinpirol (AUC relativa; *Quinpirol* 2.495 ± 0.224 vs *Quinpirol + Sulpiride* 3.978 ± 0.261 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3) Cabe resaltar que entre las condiciones control, sulpiride y quinpirol + sulpiride, no hay una diferencia significativa (ns) (AUC relativa; *Control* 4.110 ± 0.312 vs *Sulpiride* 4.490 ± 0.218 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, AUC relativa; *Control* 4.110 ± 0.312 vs *Quinpirol + Sulpiride* 3.978 ± 0.261 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3).

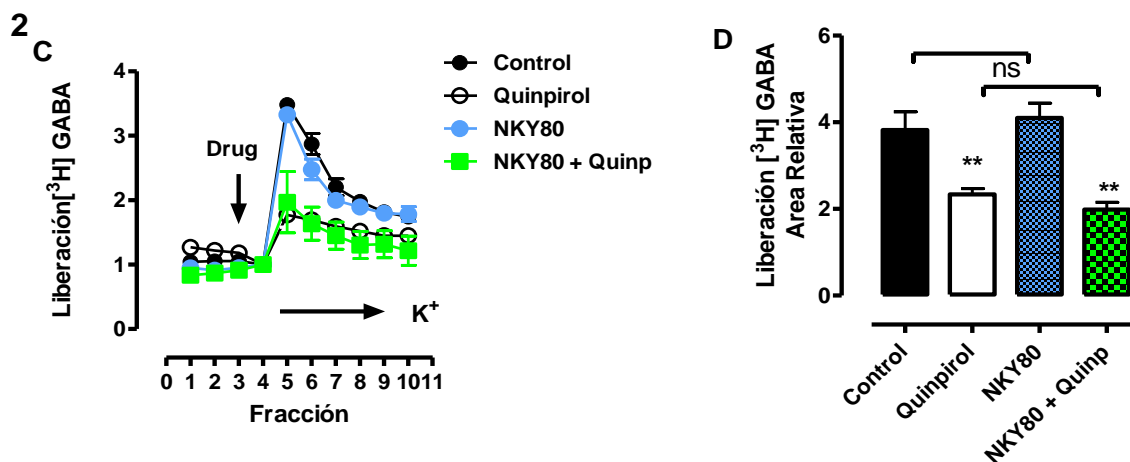


Fig. 2 C, Gráfica de fracción colectada vs liberación de [³H] GABA, Quinpirol [10μM], NKY [10μM] en el momento de la despolarización es notable que en la condición con NKY-80 +Quinpirol esta es de menor magnitud que la Control y la condición con solo NKY-80, lo cual se confirma con el cálculo del AUC relativa. **D**, Gráfico de barras AUC relativa de cada condición. NKY no previene el efecto del Quinpirol (AUC relativa; *Quinpirol* 2.337 ± 0.1342 vs *Quinpirol + NKY-80* 1.983 ± 0.1667 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3). El NKY no modifica la liberación respecto al tratamiento control (AUC relativa; *Control* 3.820 ± 0.4244 vs *NKY-80* 4.103 ± 0.5835 , $p < 0.05$ ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3).

Siguiendo el protocolo se procedió a bloquear la vía señalizada por PKA con H-89 [10µM] un inhibidor selectivo de esta cinasa ^{19,20} y es a estimular el D₂ con Quinpirol [10µM] haciendo grupos en las siguientes condiciones; Control, Quinpirol, H-89 y H-89 + Quinpirol (Fig. 3). Encontramos que el efecto del H89 sobre la liberación de GABA no es diferente de la condición Control, ligeramente por debajo pero no de manera significativa (**AUC relativa; Control 4.083 ± 0.346 vs H-89 3.527 ± 0.392, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**) (Fig. 3, F). Al combinar el H-89 + Quinpirol no hay alguna diferencia significativa con la condición que solo inhibe la liberación en presencia de Quinpirol (**AUC relativa; H-89 + Quinpirol 1.657 ± 0.69 vs Quinpirol 2.100 ± 0.347, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**), y el efecto de esta combinación sobre la liberación de [³H] GABA es menor que en la condición control (**AUC relativa; Control 4.083 ± 0.346 vs H-89 + Quinpirol 1.657 ± 0.069, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**) y que la condición donde solo se estimula con H-89. (**AUC relativa; H-89 3.527 ± 0.392 vs H-89 + Quinpirol 1.657 ± 0.069, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**) (Fig. 3, F).

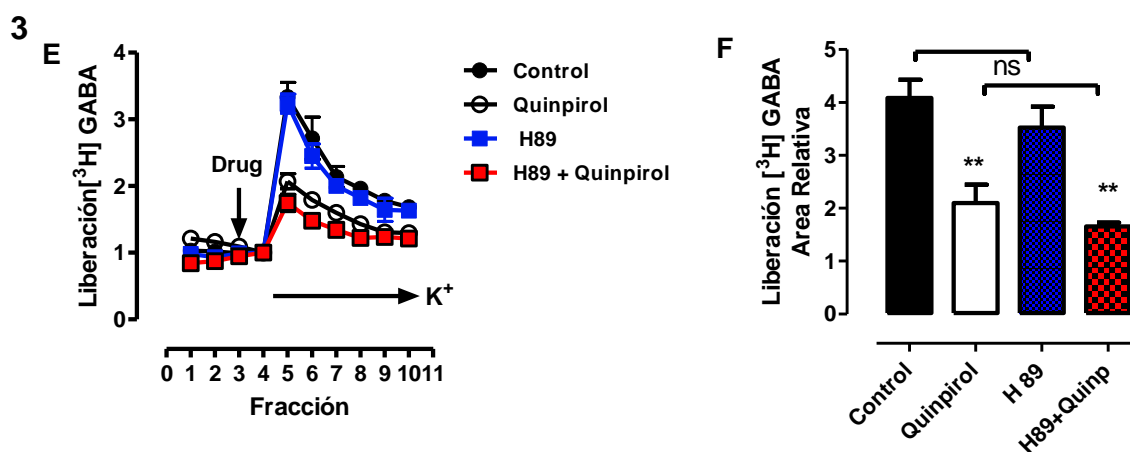


Fig. 3 E, Gráfica de fracción colectada vs liberación de [³H] GABA, Quinpirol [10µM], H - 89 [10µM]. La despolarización en la condición donde se combinó H-89 + Quinpirol fue la mas baja de todo el experimento. **F,** Gráfico de Barras AUC relativa, encontramos una diferencia no significativa (ns) entre las condiciones H-89 respecto del Control (AUC relativa; Control 4.083 ± 0.346 vs H-89 3.527 ± 0.392, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3); El tratamiento con H-89 no modifica la acción del Quinpirol al administrarse en conjunto, (AUC relativa; H-89 + Quinpirol 1.657 ± 0.69 vs Quinpirol 2.100 ± 0.347, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3).

3) Efecto del bloqueo de la vía PLC→PKC sobre la inhibición de los receptores D2 de la liberación de GABA.

Acorde al protocolo se llevaron a cabo experimentos de liberación de [³H] GABA evaluando el efecto del U 73122 ²¹ [10μM] como bloqueador selectivo de esta la PLC (Fig. 4) y Quinpirol [10μM] como agonista de los receptores D₂. En la Fig. 4 G es muy claro que el efecto de las condiciones Control, U 73122, U 73122 + Quinpirol en el momento de la despolarización son casi de la misma magnitud lo cual fue confirmado con la gráfica del cálculo del AUC (Fig. 4H). También se encontró que el efecto del U 73122 no modifica la liberación en comparación con el grupo control (**AUC relativa; Control 3.987 ± 0.106 vs U 73122 4.067 ± 0.070, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**) y que administrarlo al mismo tiempo que el Quinpirol es capaz de prevenir el efecto inhibitorio debido al Quinpirol, hasta niveles donde se administra solo U 73122 (**AUC relativa; U 73122 + Quinpirol 3.790 ± 0.190 vs U 73122 4.067 ± 0.070, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**), o del grupo Control (**AUC relativa; Control 3.987 ± 0.106 vs U 73122 + Quinpirol 3.790 ± 0.190, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey**) (Fig. 4H).

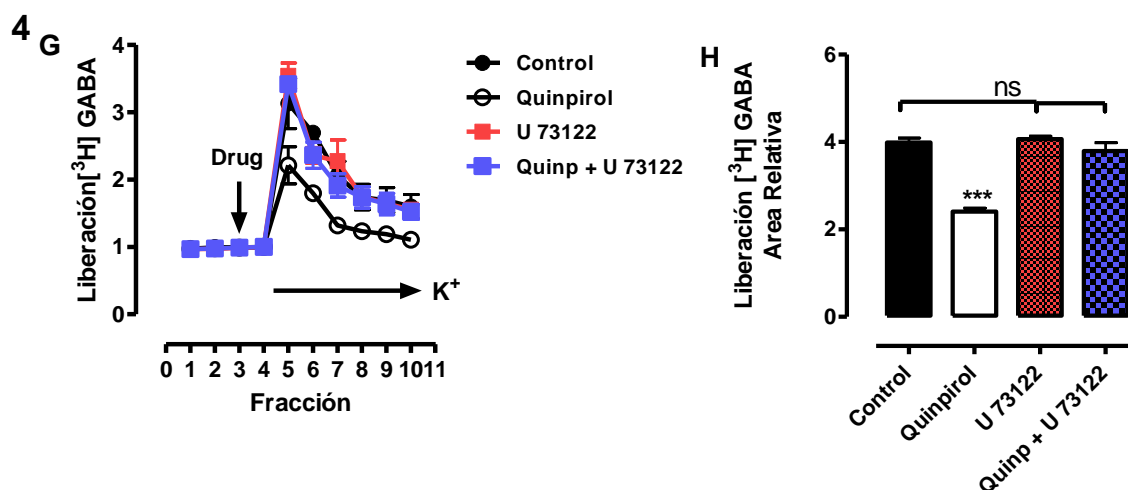


Fig. 4. G Gráfica de fracción colectada vs liberación de [³H] GABA, Quinpirol [10μM], U 73122 [10μM] la despolarización en el grupo Quinpirol es notablemente mas baja la cual es compensada por el U 73122 en el grupo representado de color morado . **H** Gráfico de Barras AUC relativa, U 73122 mantiene la liberación de GABA en niveles del grupo Control (AUC relativa; Control 3.987 ± 0.106 vs U 73122 4.067 ± 0.070, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3), U73122 previene el efecto del Quinpirol administrados en conjunto, (AUC relativa; Quinpirol 2.410 ± 0.075 vs Quinpirol +U 73122 3.790 ± 0.190, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3).

Con lo planteado en el protocolo se realizó una serie de experimentos para evaluar el bloqueo de la vía de señalización a nivel de la PKC con un inhibidor selectivo el Gö 6983²² [10µM] (Fig. 5). Durante el experimento se encontró que la liberación del grupo Control y Gö 6983 son muy similares. Combinando los fármacos, la respuesta en el punto de despolarización es semejante al grupo con Quinpirol [10µM] (Fig. 5 I). La respuesta encontrada en la liberación de [³H]GABA en el grupo con Gö 6983 no modificó significativamente el efecto respecto con el grupo control (AUC relativa; *Control* 3.947 ± 0.101 vs *Gö 6983* 3.583 ± 0.288, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey) (Fig. 5 J). De igual manera la condición al evaluar en conjunto el Gö 6983 + Quinpirol no modifica la acción del Quinpirol (AUC relativa; *Quinpirol* 2.250 ± 0.288 vs *Gö 6983 + Quinpirol* 2.373 ± 0.072, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey) (Fig. 5, J).

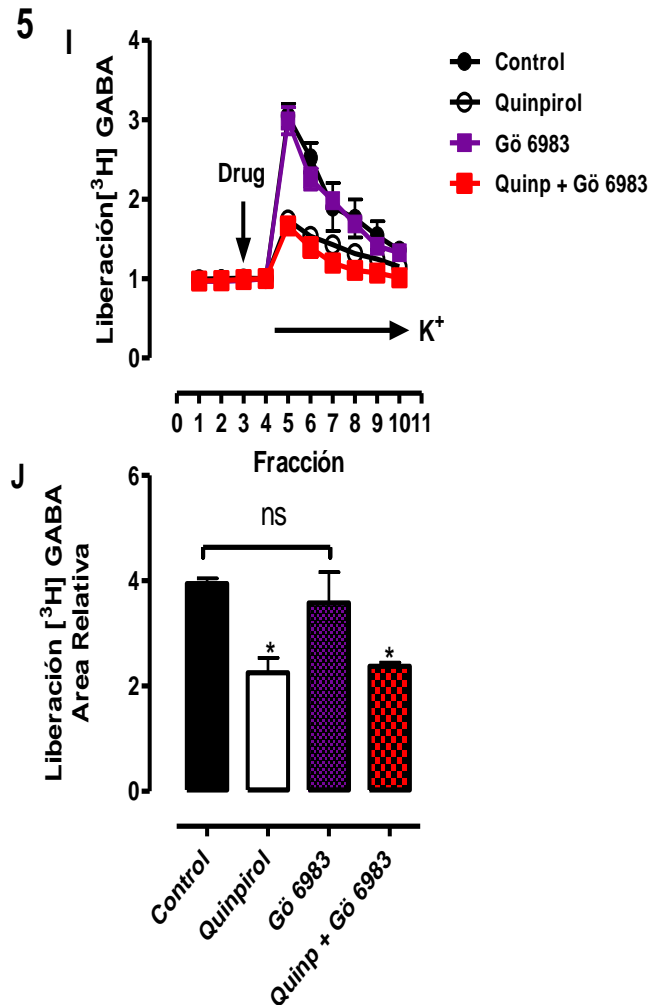


Fig. 5, I. Gráfica de fracción colectada vs liberación de [³H] GABA, Quinpirol [10µM], Gö 6983 [10µM] en el momento de la despolarización el grupo Gö 6983 libero casi la misma cantidad de [³H] GABA. J, Gráfico de Barras AUC relativa, el tratamiento Quinpirol + Gö 6983 no muestra una diferencia significativa (ns) respecto al tratamiento Quinpirol, (AUC relativa; *Quinpirol* 2.250 ± 0.288 vs *Gö 6983 + Quinpirol* 2.373 ± 0.072, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3), Gö 6983 no modifica la liberación respecto a la liberación Control (AUC relativa; *Control* 3.947 ± 0.101 vs *Gö 6983* 3.583 ± 0.288, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3).

4) Efecto del Bloqueo de Canales Ca²⁺ tipo L sobre la inhibición de la liberación de GABA mediada por receptores D₂.

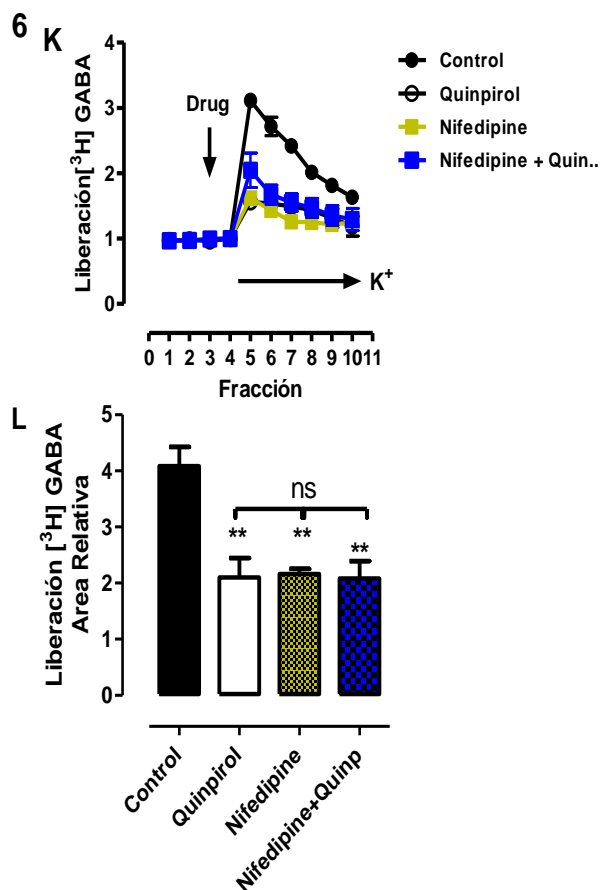


Fig. 6 K Gráfica de fracción colectada vs liberación de [³H] GABA, Quinpirol [10μM], Nifedipino [10μM] en el momento donde se provoca la despolarización la liberación de [³H] GABA es mayor en el grupo control. **L** Gráfico de Barras AUC relativa. El Nifedipino al igual que el Quinpirol disminuyen drásticamente la liberación de [³H] respecto al Control (AUC relativa; *Control* 4.083 ± 0.346 vs *Quinpirol* 2.100 ± 0.347, p<0.05 ANOVA de una vía; prueba de Tuckey, *Control* 4.083 ± 0.346 vs *Nifedipino* 2.163 ± 0.086, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3) la liberación entre los tratamientos Quinpirol y Nifedipino no muestran diferencia entre si (ns), ni al administrarse en conjunto (AUC relativa; *Nifedipino* 2.163 ± 0.086 vs *Quinpirol* 2.100 ± 0.347, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey; *Quinpirol* 2.100 ± 0.347 vs *Quinpirol + Nifedipino* 2.080 ± 0.310, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3; *Nifedipino* 2.163 ± 0.086 vs *Quinpirol + Nifedipino* 2.080 ± 0.310, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey, experimentos n=3).

Para finalizar se bloqueó con Nifedipino [10μM] los canales de Ca²⁺ tipo L²³, evaluando la inhibición de la liberación por receptores D₂ (Fig. 6). En esta serie el grupo Control presentó el mayor pico de despolarización; los otros grupos, presentaron cantidades de liberación similares con el incremento de la concentración K⁺ (Fig. 6K).

Analizando el AUC se observó que el efecto del Nifedipino sobre la liberación de [³H] GABA es un efecto muy similar al ejercido por Quinpirol solo (AUC relativa; *Nifedipino* 2.163 ± 0.086 vs *Quinpirol* 2.100 ± 0.347, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey) (Fig. 6, L). El efecto del grupo Nifedipino + Quinpirol es también similar al del grupo evaluado solamente con Quinpirol (AUC relativa; *Quinpirol* 2.100 ± 0.347 vs *Quinpirol + Nifedipino* 2.080 ± 0.310, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey) (Fig. 6, L) lo mismo ocurre al compararlo con el grupo tratado con Nifedipino (AUC relativa; *Nifedipino* 2.163 ± 0.086 vs *Quinpirol + Nifedipino* 2.080 ± 0.310, p<0.05 ANOVA de una vía, prueba de Tuckey) (Fig. 6, L).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

El proyecto se desarrolló con el objetivo de encontrar que ruta neuroquímica se encontraba involucrada en la señalización de los receptores a dopamina D₂ presinápticos, con la cual se controla la liberación de GABA en terminales estriado-palidales.

1.- El tejido cerebral rebanado.

Para poder hallar la vía bioquímica por la cual el receptor D₂ inhibe la liberación de GABA, se midió el efecto de la estimulación de los receptores D₂ mediante experimentos de liberación y cuantificación de GABA en rebanadas de globo pálido de rata; desde la década de los 80's la preparación de rebanadas cerebrales ha sido considerada clave para el estudio de receptores pre-sinápticos; en estas preparaciones los receptores evaluados responden de una manera natural a los cambios de la actividad intraterminal provocados en la técnica ²⁴.

La obtención de rebanadas de globo pálido se obtiene a partir de cortes coronales, cada capa de tejido nervioso con 300 µm de espesor, posee terminales pre-sinápticas provenientes del estriado con los receptores a dopamina D₂ ²⁵, en la porción post-sináptica encontramos los somas y dendritas neuronales acompañadas de células gliales presentes en el globo pálido. La conservación de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de estos componentes celulares permite mantener en funcionamiento los procesos celulares de biosíntesis, transporte y liberación de neurotransmisores, intercambio iónico, actividad enzimática etc. La solución Krebs–Henseleit cuya composición ya descrita en la metodología asemeja el fluido extracelular en el cerebro, mantiene la osmolaridad en el tejido, y en conjunto con una temperatura de 36 °C, más la saturación de O₂ en el medio como constantes, nos permite preservar dichas características durante horas ²⁶.

Es importante resaltar las principales ventajas y desventajas de la utilización de tejido cerebral como instrumento experimental para el estudio de la señalización bioquímica de receptores pre-sinápticos.

Principales ventajas de las preparaciones

- Las rebanadas permiten por medio de su incubación y perfusión una interacción directa con los fármacos agonistas y antagonistas del receptor así como con inhibidores selectivos de enzimas y/o canales iónicos, esto ayuda a determinar concentraciones constantes para la evaluación del receptor ó procesos bioquímicos. Lo anterior posibilita la manipulación farmacológica necesaria para obtener curvas dosis respuesta, determinar mecanismos de antagonismo, potenciación, sinergismo, oclusión, competitividad y hasta la evaluación de nuevas moléculas.
- La ausencia de barreras naturales y vías metabólicas que pueden impedir la llegada al blanco, alterando la estructura química como puede ser una ionización, hidrólisis, oxidación y reducción, ó simplemente impedir su paso en el caso de barreras; permite observar el efecto esperado.
- Los cortes y disecciones adecuados, permiten evaluar solamente el efecto en los receptores de núcleos específicos de interés del sistema nervioso.

Las ventajas señaladas permitieron el estudio exclusivo del efecto en la inhibición de la señalización los receptores así como de la activación e inhibición de los mismos, ubicados en las terminales pre-sinápticas del Globo pálido de rata; la interacción tejido-receptor-fármaco se llevó acabo satisfactoriamente, debido a que la magnitud en la respuesta fue medible, y modificada respecto al efecto de cada fármaco utilizado.

Desventajas básicas inherentes a las preparaciones

- Una mala disección puede llevar a la disminución de terminales neuronales en la preparación alterando significativamente el efecto debido al estímulo a realizar.
- Algunos activos pueden tener características físicas, químicas y/o bioquímicas, presentar reacciones de degradación por factores externos, problemas de difusión, esto puede disminuir la concentración en los espacios pre-sinápticos alterando el efecto deseado.
- Cambios drásticos en el sistema que modifiquen por ejemplo el equilibrio osmótico, la temperatura, la saturación de O₂ en el medio, un flujo turbulento de perfusión; que provoquen un daño físico en la preparación puede dejar inservible las muestra o modificar la respuesta obtenida.

La técnica ha sido mejorada desde su implementación en el laboratorio donde se llevo a cabo, de tal modo que las principales desventajas no tuvieron una repercusión significativa en los resultados. Debido a que las preparaciones conservan las aferentes así como sus propiedades de almacén, y liberación de neurotransmisores, prueba de este hecho fué que el pulso despolarizante provocó la liberación de GABA probando así su integridad funcional.

El tiempo de latencia corto presentado por parte de los principios activos sugiere que, la disolución de las moléculas fue adecuada lo que llevó a tener una concentración del activo en el medio de perfusión y en los espacios sinápticos casi iguales o por lo menos lo suficiente para poder ejercer su efecto, de lo contrario no se hubiese detectado el efecto ó el tiempo de latencia hubiese sido mas prolongado.

La preparación de las solución Krebs-Henseleit y, tanto para la disección, la incubación, la perfusión así como la solución despolarizante Krebs-Henseleit alto K⁺, se comportaron efectivamente como el medio extracelular, la utilización de rebanas en promedio del

mismo grosor y suficientemente delgadas nos permite llevar a cabo una mejor difusión tanto de nutrientes como de fármacos, de igual manera que las rebanadas sean lo bastante gruesas permite disminuir la posibilidad de trabajar con tejido dañado por la disección^{27,28} lo cual mejora la observación del evento. Mantener en óptimas condiciones la temperatura de las soluciones y la velocidad de flujo de las soluciones durante la perfusión, ayudó a preservar las preparaciones responsivas solamente a los cambios provocados por los fármacos utilizados.

2.- Captura, liberación y recaptura de GABA

Es evidente que trabajar con sistemas nativos nos hace enfrentarnos con procesos de captura y liberación de GABA que se llevan naturalmente en las terminales nerviosas y que pueden alterar la cuantificación del neurotransmisor^{29,30}.

El GABA es almacenado temporalmente en vesículas para su liberación. La liberación de neurotransmisores a partir de vesículas sigue un complejo proceso que es desencadenado por el influjo de Ca^{2+} en la terminal pre-sináptica por medio de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los iones Ca^{2+} activan la sinaptotagmina una proteína de membrana que promueve la interacción de las proteínas SNARE (Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor) de la vesícula y la membrana celular. Las proteínas SNARE fusionan la membrana de la vesícula con la membrana pre-sináptica en una zona activa donde se lleva a cabo la liberación del neurotransmisor por exocitosis³¹.

La acción del GABA sobre los receptores post-sinápticos finaliza cuando es recapturado^{32,33,34}, esta acción puede llevarse a cabo desde la terminal pre-sináptica o por las células gliales^{35,36}, gracias a este proceso las terminales estriado-palidales pueden endocitar el [³H]-GABA para liberarlo durante la estimulación^{37,29,30}. Las células gliales son muy afines a la recaptura del GABA, por lo cual no se descarta la captura del [³H]-GABA también pueda suceder por parte de ellas^{26,37}.

La estimulación con la solución alta en K^+ para la liberación lleva consigo la activación de los procesos de captura de GABA ³⁸ previamente mencionada, este evento podría repercutir sobre la cuantificación de [³H]-GABA. Este detalle se previene con la utilización de ácido nipecótico, un isoaxol cuya utilización en rebanada es común, posee una potente afinidad por los transportadores de GABA membranales, tanto gliales como de aferentes, mostrando mas afinidad por los primeros, además no interviene en el metabolismo del neurotransmisor, la IC₅₀ (Concentración inhibitoria máxima media) del ácido nipecótico es de 9 μ M un valor más bajo que la de otros inhibidores. ^{39, 40, 41}. Para el sistema utilizamos una concentración de 10 μ M durante la perfusión de las rebanadas, para asegurar la inhibición de la recaptura, sumado al efecto de barrido debido a la perfusión de las rebanadas se evita la acumulación de GABA, optimizando la cuantificación de este.

3.- Metabolismo del [³H]-GABA

La degradación catabólica del GABA se lleva a cabo por la enzima GABA-T la cual provoca una transaminación como parte del proceso natural de biosíntesis, vesiculación, liberación, recaptura y metabolismo del GABA ^{42, 43, 44}, debido a que el [³H]-GABA puede ser metabolizado al igual que el GABA natural, es necesario asegurar que la cuantificación se debe al [³H]-GABA inalterado y no a un metabolito, la adición de ácido aminooxiacético en las soluciones de Krebs-Henseleit ayuda a inhibir la acción de la GABA T, y no interfiere con los procesos de captura y liberación ⁴⁵.

4.- Estimulación de la liberación

En los modelos de liberación de neurotransmisores de preparaciones in-vitro se encuentran principalmente la utilización de estimulación eléctrica²⁶, incremento de gradientes de concentración de $[K^+]$ ⁴⁶ e inducción por veratridina⁴⁷. En particular la estimulación por el incremento de la concentración de K^+ se puede mantener por un tiempo prolongado y con una intensidad continua⁴⁸, en nuestro tipo de estimulación el equilibrio de los iones K^+ y Cl^- antes mencionado es un punto crítico al momento de inducir el pulso despolarizante; la utilización excesiva de K^+ en el pulso despolarizante puede causar daño en la tonicidad del tejido, además de provocar la liberación de neurotransmisor de células gliales o el citoplasma, donde también hay una captura de $[^3H]$ -GABA^{26 37}. También destaca el hecho de que la liberación de GABA en terminales nerviosas es dependiente del influjo de Ca^{2+} extracelular, en contraste con la liberación glial que no es Ca^{2+} dependiente²⁶.

5.- Tratamiento con Reserpina

La Reserpina es un inhibidor irreversible del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2), dicha inhibición provoca una depleción de catecolaminas en las terminales nerviosas, lo que físicamente se refleja como hipolocomoción y rigidez muscular. Se ha reportado que dosis en el rango de los 1 a 5 mg/kg ya provoca alteraciones en el movimiento en roedores. Inclusive tratamientos crónicos con este fármaco, son clasificados como modelos experimentales de Parkinson⁴⁹. El objetivo de la dosis administrada de reserpina en nuestro modelo, nos permite obtener tejido sin Dopamina al momento de hacer el experimento, por lo que la magnitud de la respuesta obtenida por la activación de receptores D_2 en la liberación es debida al tratamiento farmacológico y no a la dopamina propia del tejido¹⁴.

ACTIVAR RECEPTORES D₂ INHIBE LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO.

Determinar la ruta bioquímica de los receptores a Dopamina tipo D₂ en el globo pálido hizo necesario replicar el efecto inhibitor de estos receptores⁵⁰ ya reportado en otros trabajos; para lograr esto se estimuló al receptor con Quinpirol y se bloqueó con Sulpiride, ambos fármacos selectivos^{16, 17, 14} al receptor, así como ampliamente utilizados en el estudio de los receptores D₂. Con estos experimentos se confirmó la presencia del receptor en las preparaciones experimentales debido a que el efecto producido por su agonista es exclusivo del mismo. Por lo que se sugiere que la vía de señalización provoca un efecto inhibitor en la liberación del GABA en el globo pálido, y que el bloqueo de la misma llevaría a observar un cambio en el efecto de la misma.

LOS RECEPTORES D₂, LA VÍA ADENILATO CICLASA -> PKA Y LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO.

Para discriminar entre las posibles interacciones bioquímicas por las que el receptor D₂ puede inhibir la liberación de GABA en el globo pálido, el primer paso fue la evaluación de la vía Adenilato ciclasa -> PKA por medio del bloqueo del AC y de la PKA, para justificar la estrategia, con apoyo en lo descrito en el marco teórico partimos del hecho que los receptores D₂ al estar acoplados a una proteína Gi la subunidad G α i bloquea a la adenilato ciclasa impidiendo la síntesis de AMPc, lo que impide la activación de la PKA y esta no ejercería su acción sobre canales de Na⁺ y Ca²⁺. Actualmente se conocen 5 isoformas de la AC de las cuales se han estudiado diversos patrones de activación y bloqueo⁵¹, en tejido cerebral de roedores se ha encontrado que la isoforma 5 se encuentra involucrada funcionalmente con los receptores D₂⁵² la cual es bloqueada con la subunidad G α i⁵³, con base en esto se eligió el NKY-80 del cual se reporta una potente y selectiva inhibición de la AC5¹⁸. De igual manera se ha reportado la actividad de la PKA en tejido estriado y núcleo acumbens mediante la activación de los receptores D₂^{54, 55}. El H-89 fue seleccionado como bloqueador de la PKA por ejercer un efecto potente y selectivo en esta enzima^{19, 20}.

Los resultados de los tratamientos farmacológicos bloqueando específicamente a la AC y a PKA (Fig. 2D, Fig. 3 F) sugieren que esta vía no repercute de manera significativa en la liberación de [³H]-GABA de pre-sináptico en el globo pálido, por lo que se descarta su participación en la señalización del receptor D₂ con el fin de inhibir la liberación de GABA, esto se refuerza por el hecho de que la activación simultánea del receptor D₂ junto con el bloqueo de estas enzimas, sigue teniendo el mismo efecto como si solo se activara al receptor D₂, por lo que la ruta que inhibe la liberación de GABA sigue activa y funcionando normalmente. Sumando dichos eventos se puede asumir que los receptores D₂ no inhiben la liberación de GABA en el globo pálido mediante la inhibición de la formación de AMPc, a través de la acción de su subunidad G αi.

LOS RECEPTORES D₂, LA VÍA PLC -> PKC -> CANAL Ca²⁺ TIPO L Y LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO.

El siguiente paso, planteado en la búsqueda de la manera en que los receptores D₂ inhiben la liberación de GABA, parte del hecho de que el receptor al estar acoplado a proteínas Gi cuya naturaleza trímera permite desencadenar procesos bioquímicos por medio de la separación de sus subunidades Gαi y Gβγ. Con base en lo descrito en el marco teórico encontramos que la subunidad Gβγ puede activar la PLC β^{10, 11} la cual promueve la formación de IP₃, los receptores de IP₃ en la membrana de los reservorios de Ca²⁺ como el retículo endoplásmico, movilizan calcio que puede activar enzimas como la calcineurina (Proteína Fostasa 2B, PP2B) para desfosforilar los canales de Ca²⁺ tipo L⁵⁴ y provocar la inhibición de la liberación de GABA debido al bloqueo de los canales. Simultáneamente la producción de IP₃ libera DAG, el DAG activa a la PKC^{24, 57}, en conjunto con el Ca²⁺, cuya actividad repercute sobre los canales de Ca²⁺ tipo N y canales de Na⁺ alterando la sensibilidad de la membrana celular⁵⁸ pudiendo modular la liberación del neurotransmisor. Para la evaluación de esta vía de señalización hipotética se propuso bloquear a la PLC con U 73122²¹, a la PKC con Gö 6983²², y al canal de Ca²⁺ tipo L con nifedipino²³, este último para corroborar que la actividad en estos canales es determinante para la liberación del neurotransmisor.

En los resultados se puede observar que el bloqueo exclusivo de la PLC sin la estimulación del receptor propone que la PLC no tiene un papel importante en la inhibición de liberación de GABA. En contraste la activación simultánea del receptor D_2 al bloqueo de la PLC sugiere fuertemente que la actividad de la PLC resulta determinante como inicio de la señalización del receptor para inhibir la liberación de GABA pues su bloqueo muy posiblemente interrumpe la formación del IP_3 cuya actividad antes descrita puede liberar Ca^{2+} intracelular y el DAG para activar a la PKC (Fig. 4).

Prosiguiendo con la evaluación de la vía hipotética; analizando la serie experimental para bloquear a la PKC sugiere que esta no interviene en la señalización del receptor (Fig. 5), pues la vía se activa de manera indistinta cuando solo se activa al receptor que cuando se bloquea a la PKC simultáneamente a la activación del receptor, de modo que esto descarta que la activación de la PKC por medio de DAG, sea el siguiente paso en la señalización de D_2 con el fin de la inhibición de la liberación GABA.

Por último, el bloqueo de los canales de Calcio tipo L, confirma que la liberación de GABA es regulada por estos canales, pues el bloqueo exclusivo de estos canales provoca una disminución en la liberación. Al ser evaluado este efecto en conjunto con la activación del receptor por Quinpirol nos permite proponer que; la señalización de los receptores D_2 ejerce un efecto sobre los canales de Ca^{2+} tipo L, pues de no ser así, la vía al estar activa sin influir en los canales de Ca^{2+} ya bloqueados por Nifedipino, posiblemente se promovería una mayor inhibición, evento que no ocurre, pues como se observa en la Fig. 6 al encontrar una liberación de magnitudes similares en las 3 condiciones propuestas se hace evidente que, el blanco tanto de la vía, como del fármaco, son los canales de Ca^{2+} .

Resumiendo, los resultados obtenidos en este proyecto, descartan que la inhibición de la liberación de GABA mediada por los receptores D_2 en el globo pálido de rata sea por medio de una señalización en el orden $G\alpha_i \rightarrow AC \rightarrow PKA$, descartan parcialmente la hipótesis planteada que propone una vía $G\beta\gamma \rightarrow PLC \rightarrow PKC \rightarrow$ Canal Ca^{2+} tipo L. Sin embargo los resultados nos llevan a proponer que; la estimulación de los receptores D_2 en el globo pálido por medio de la porción $G\beta\gamma$ de la proteínas G_i a las cuales se encuentran

acoplados, activan a la PLC, que estimula la formación de IP₃, promoviendo una liberación de Ca²⁺ intracelular y provoca la activación de PP2B (calcineurina), enzima que desfosforilando los canales de Ca²⁺ tipo L disminuye la liberación de GABA, como se ha propuesto que funciona en el núcleo estriado⁵⁶, y reforzando la idea de que los canales de Ca²⁺ modulan la liberación de GABA generada por la dopamina tanto en la Sustancia Nigra como en el Globo Pálido de rata⁵⁹. Este tipo de hallazgos pueden ser de gran utilidad para el diseño de nuevos tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas como el mal del Parkinson, a través de la propuesta de nuevos blancos terapéuticos fundamentados en la interacción con la señalización bioquímica en las neuronas para la liberación de amino ácidos como el GABA.

CONCLUSION

Se logró comprobar que la señalización los receptores a Dopamina D₂ en las terminales estriado-palidales, involucra principalmente la activación de la PLC y que esta activación involucra la disminución de la actividad de canales de Ca²⁺ tipo L, cuya participación es determinante en el control de la liberación de GABA.

PERSPECTIVAS

- 1.- Determinar si la movilización de compartimientos intracelulares participa en la respuesta inhibitoria de la activación de los receptores D₂.
- 2.- Estudiar la vía de señalización de los receptores D₂ en condiciones de Parkinson experimental.
- 3.- Estudiar si los fármacos con acción sobre los receptores D₂ modifican la actividad motora.

REFERENCIAS

- 1) Cooper J, Bloom F, Roth R, The Biochemical Basis of Neuropharmacology, 8ed. OXFORD University press. 2008.
- 2) Flórez J, Farmacología Humana, 3ed. MASSON 1997.
- 3) Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. Neuroscience and Behavioral Reviews. 2000; 24: 125-132.
- 4) Dunnett S, Bentivoglio M, Björklund. A, Hökfelt T. Dopamine, Handbook Of Chemical Neuroanatomy, volumen 21, Elsevier 2005.
- 5) Cuevas S, Villas AV, Jose PA, Armando I. Renal Dopamine Receptors, Oxidative Stress, and Hypertension. International Journal of Molecular Sciences. Review, 27 August 2013; 14: 17553-17572.
- 6) Iturriaga R, Alcayaga J, Gonzalez C. Neurotransmitters in Carotid Body Function: The Case of Dopamine. Invited Article. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2009; 648: 137-143.
- 7) Rommelfanger KS, Wichman T. Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. Frontiers in neuroanatomy, Review article, 27 October 2010; 4: 1-17.
- 8) Nestler E, Hyman S, Malenka R, Molecular. Neuropharmacology a foundation for Clinical Neuroscience. 2 ed. Mc Graw Hill 2009
- 9) Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine Receptor Signaling. Journal of receptors and signal transduction. 2004; 24 (3): 165–205.
- 10) Jope RS, Li X, Pacheco MA, The Phosphoinositide signal transduction system. In : Boulton AA, Baker GB, Bateson AN. Neuromethods, In vitro Neurochemical Techniques;34 Humana Press Inc.; 1999.

- 11) Islam S, Calcium Signaling, *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer 740. Uppsala Suecia: Zeng L, Webster S, y Newton P; 2012. Chapter 28, The Biology of Protein Kinase C; p.639-61.
- 12) Florán B, Silva I, Nava C, Aceves J. Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA_A receptors in pars compacta and by GABA_A receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *European Journal of pharmacology*. March 1988; 150: 277-286.
- 13) Florán B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D. Activation of D₁ dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neuroscience Letters*. August 1990; 116: 136-140.
- 14) Florán B, Silva I, Nava C, Aceves J. D₂ receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neuroscience Letters*. November 1997; 237: 1-4.
- 15) Florán B, Gonzalez B, Florán L, Erij D, Aceves J. Interactions between adenosine A_{2a} and dopamine D₂ receptors in the control of [³H]GABA release in the globus pallidus of the rat. *European Journal of Pharmacology*. September 2005; 520: 43-50.
- 16) Schwartz JC, Giros B, Martres MP, Sokoloff P. The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology, *seminars in The Neurosciences*. 1994; 4: 99-108.
- 17) Zahniser N, Dubocovich M, Comparison of Dopamine Receptor sites labeled by [³H]-S-Sulpiride and [³H]-Spiperone in Striatum. *The Journal of Pharmaceutical and Experimental Therapeutics*. August 1983; 221 (3): 592 – 599.

- 18) Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazako H, Toya Y, Sakai I, Homcy CJ, Nishikawa K, Ishikawa Y. Type-specific Regulation of Adenylyl Cyclase, Selective Pharmacological Stimulation And Inhibition Of Adenylyl Cyclase Isoforms. *The Journal of Biological chemistry by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.* 21 December 2001; 276 (51): 47785–47793.
- 19) Lochner A, Moolman J. The Many Faces of H89: A Review, *Cardiovascular Drug Reviews.* 2006; 24 (3–4): 261–274.
- 20) Davies S, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitor. *Biochemical Journal.* 2000; 351: 95-105.
- 21) Bleasdale J, Fisher S. Use of U-73122 as an Inhibitor of Phospholipase C-Dependent Processes, *British Journal of Pharmacology.* July 2010; 160 (6): 1295–1301.
- 22) Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller H, Johannes F. Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters.* 1996; 392: 77-80.
- 23) Wu L, Karpinski E, Wang R, Panq PK. Modification of the nifedipine on calcium channel currents in neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Abril 1992; 345 (4): 478 - 84.
- 24) Chesslet M F, Presynaptic regulation of neurotransmitter realease in the brain. *Neurosciense.* 1984; 12 (2): 347- 375.
- 25) Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara R K, Niznik H B, Kitt CA, Price D L, Maggio, R, Brann MR, Ciliax BJ. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1993; 90 (19): 8861–8865.
- 26) Orrego F. Criteria for the identification of central neurotransmitters and their applications to studies with some nerve tissue preparation in vitro. *Neuroscience.* 1978; 4(8): 1037-57.

- 27) Cohen S R. The dependence of water content and “extracellular “ marken spaces of incubate mouse brain slices on thickness, alterations produced by slicing and fluid spaces in intact and altered tissue. *Exp Brain Research*. 1974; 20(5): 435-57.
- 28) Sershen H, Lajtha A. The distribution of aminoacids, Na⁺ and K⁺ from surface to centre in incubed slices of mouse brain. *Journal of Neurochemistry*. 1974; 22(6): 977-85.
- 29) Santos M S, Goncalves PP, Carvalho AP. Compartametizazione and release of exogenous GABA in sheep brain Synaptosomes. *Neurochem Research*. 1987; 12(3): 297-304.
- 30) Kontro P, Oja S S. Taurine and GABA release for mouse cerebral cortex slices: effects of structural analogues and drugs. *Neurochemical Research*. 1987; 12(5): 475 – 482.
- 31) Fletcher A. Nerve cell function and synaptic mechanism, *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. Junio 2011; 12 (6): 253 – 257.
- 32) Hertz L. Functional Interaction between neurons and astrocytes I. Turover and metabolism of putative amino acid neurotransmitters. *Prog. Neurobiology*. 1979; 13(3): 277-323.
- 33) Mulder A H. An overview of subcellular localization, release and termination of action of amine, amino acids, and peptide neurotransmitters in the central nervous system. *Progs. Brain Research*. 1982; 55: 135-56.
- 34) Iversen L L .Aminoacids and peptides; fast and slow chemical signals in the nervous system. *Proc. R. Soc. Lond*. 1984; 221(1224):245-60.
- 35) Hen F A, Hamberger A. A glial cell function: uptakes of transmitters substances. *Proc. Natl. Aca Sci*. 1971 Nov; 68(11): 2686-90.
- 36) Schon F, Kelly J S. Selective uptake of [3H] b-alanine by glia; association with the glial uptake system for GABA. *Brain Research*. 1975 Mar 21;86(2):243-57.

- 37) Fagg G E, Lane J D. The uptake and release of putative amino acid neurotransmitters, *Neuroscience*. 1979;4(8):1015-36.
- 38) Iversen L L, Neal M J, The uptake of [3H] GABA by slices of rat cerebral cortex, *Journal of Neurochemistry*. 1968; 15(10) : 1141 – 1149.
- 39) Krogsgard-Larsen P, Johnston G A R, Inhibition of GABA uptake in rat brain slices by nipecotic acid, various isoaxoles and related compounds, *Journal of Neurochemistry*. 1975 Dec;25(6):797-802.
- 40) Szerb J C, Effect of nipecotic acid, a γ -aminobutyric acid transport inhibitor, on the turnover and release of γ -aminobutyric acid in rat cortical slices. *Journal of Neurochemistry*. 1982 Sep;39(3):850-8.
- 41) Johnston G A R, Stephanson A L, Twitchin B, Uptake and release of nipecotic acid. *Journal of Neurochemistry*. 1976 Jan; 26(1): 83-7.
- 42) Sellstrom A, Sjoberg L B, Hamberger A. Neuronal systems for gamma aminobutyric acid metabolism. *Journal of Neurochemistry*. 1975 Oct; 25(4): 393-8.
- 43) Bernasconi R, Maitre L, Martin P, Raschdorf F. The use of inhibitors of GABA-transaminase for the use of inhibitors of GABA turnover in mouse brain regions; An evaluation of aminooxyacetic acid and gabaculine. *Journal of Neurochemistry*. 1982 Jan;38(1):57-66.
- 44) Bernarh S, Zigmund M J, Characterization of [3H] GABA release from striatal slices: Evidence for a calcium independent process via the GABA uptake system, *Neuroscience*. 1988 Nov; 27(2):563-70.
- 45) Snodgrass S R, Iversen L L. Effects of amino-oxyacetic acid on [3H] GABA uptake by rat brain slices. *Journal of Neurochemistry*. 1973 Feb; 20(2):431-9.
- 46) Geffen L B, Jessel T M, Cuello A C, Iversen L L. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature*. 1976 Mar 18; 260 (5548): 258-60.
- 47) Szerb J C. The release of [3H] GABA formed from [3H] glutamate in rat hippocampal slices. *Neurochemistry Research*. 1983 Mar;8(3):341-51.

- 48) Frankhyuzen AL, Mulder AH. A cumulative dose – response technique for the characterization of presynaptic receptors modulating [3H] noradrenaline release from rat brain slices. *European Journal Pharmaceutics*. 1982 Feb 19; 78(1): 91-7.
- 49) Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*. 2012 May 16;231(1):154-63.
- 50) Florán B, Paz-Bermudez F., Sierra A, Hernández J, Aceves J. Differential modulation of GABA release by D₂ and D₁ receptors in the basal ganglia of the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1996; 432(1).
- 51) Taussig R, Tang W, Hepler J, Gilman A. Distinct Patterns of Bidirectional Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclases*, *The Journal Of Biological chemistry* by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. 25 February 1994; 269 (8): 6093-6100.
- 52) Lee K, Hong J, Choi IY, Che Y, Lee J-K, Yang S-D, Song C-W, Kang HS, Lee J-H, Noh JS, Shin H-S, Han P-L. Impaired D2 Dopamine Receptor Function in Mice Lacking Type 5 Adenylyl Cyclase, *The Journal of Neuroscience*. September 15, 2002; 22 (18): 7931–7940.
- 53) Dessauer C, Chen-Goodspeed M, Chen J. Mechanism of G α i-mediated Inhibition of Type V Adenylyl Cyclase. *THE JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY* by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 9 August 2002; 277 (32): 28823–28829.
- 54) Nishi A, Bibb J. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Neurobiology. PNAS*. November 7, 2000; 97 (23): 2840–12845.

- 55) Nishi A, Snyder G, Greengard P, Bidirectional Regulation of DARPP-32 Phosphorylation by Dopamine, *The Journal of Neuroscience*. November 1, 1997; 21 (17): 8147–8155.
- 56) Hernández-López S, Tkatch T, Perez-Garcia E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. D₂ Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type Ca²⁺ Currents and Excitability via a Novel PLCβ1–IP3–Calcineurin-Signaling Cascade. *The Journal of Neuroscience*. December 15, 2000; 20 (24): 8987–8995.
- 57) Newton A. Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation, *Minireview*, *The Journal of Biological Chemistry*. December 1, 1995; 270(48): 28495–28498.
- 58) Hourez R, Azdad K, Vanwalleghem G, Roussel C, Gall D, Schiffmann S. Activation of protein kinase C and inositol 1,4,5-triphosphate receptors antagonistically modulate voltage-gated sodium channels in striatal neurons. *Brain Research*. September 2005; 1059: 189 -196.
- 59) Recillas-Morales S, Sanchez-Vega L, Ochoa-Sanchez N, Caballero-Florán I, Paz-Bermudez F, Silva I, Aceves J, Erlij D, Florán B. L-Type Ca²⁺ Channel activity determines modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra reticulata and the globus pallidus of the rat. *Neuroscience*. January 2014; 256: 292 -301.